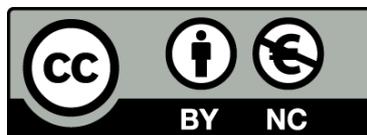




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Receptores del sistema inmunitario innato  
(*Toll-like receptors* y receptores de la Fc-gamma)  
y adaptativo (CD5 y CD6) como factores  
de susceptibilidad, modificadores de la enfermedad  
y respuesta al tratamiento biológico en psoriasis**

Marc Julià Manresa



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Universidad de Barcelona**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Medicina**

**Receptores del sistema inmunitario innato (*Toll-like* receptors y receptores de la Fc-gamma) y adaptativo (CD5 y CD6) como factores de susceptibilidad, modificadores de la enfermedad y respuesta al tratamiento biológico en psoriasis**

**Marc Julià Manresa**

**Memoria de Tesis Doctoral**

**Barcelona 2019**





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Receptores del sistema inmunitario innato (*Toll-like*  
receptors y receptores de la Fc-gamma) y adaptativo  
(CD5 y CD6) como factores de susceptibilidad,  
modificadores de la enfermedad y respuesta al  
tratamiento biológico en psoriasis**

**Marc Julià Manresa**

**Doctorando**

Programa de Doctorado de Medicina e Investigación Translacional

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina i Ciencias de la Salud

Universidad de Barcelona

**Dr. José Manuel Mascaró Galy**

**Director de Tesis**

**Dr. Francisco Lozano Soto**

**Director de Tesis**



A la meva família, per fer-me tan feliç,

A l'Aitziber, la Irati i la Jare, el meu gran tresor,  
a les meves germanes, Agnès i Marta, per tota una vida compartida,  
als meus pares Lluís i Àngels, artificis del meu jo, pel seu amor i  
tenacitat en transmetre la seva bondat i passió pel coneixement.



## Agraïments

Al **Dr. José Manuel Mascaró**, per la seva figura com a mestre i amic, pel seu compromís amb la docència i la seva passió per la Medicina i la Dermatologia.

Al **Dr. Francisco Lozano**, per la seva implicació en el projecte, el seu inestimable suport i per obrir-me les portes a la investigació.

Al **Dr. Antonio Guilabert** i al **Dr. Carlos Muñoz**, que gràcies a la seva col·laboració, treball i excel·lència han fet possible aquesta Tesis Doctoral.

A la **Dra. Marta Consuegra-Fernández**, pel seu magnífic treball i activa participació en els projectes d'investigació d'aquesta Tesis Doctoral.

A l'**Anna Esteve** pel seu accessibilitat i compromís en l'anàlisi estadístic dels diferents projectes d'investigació.

Als companys del Servei de Dermatologia del Consorci Parc Taulí, el **Dr. Jorge Romani**, i del Hospital Germans Trias i Pujol, el **Dr. Carlos Ferrándiz** y el **Dr. José Manuel Carrascosa**, per la seva generositat a l'hora de participar en els projectes que constitueixen aquesta Tesis Doctoral.

Finalment, als membres del **Servei de Dermatologia del Hospital Clínic de Barcelona** amb els que vaig coincidir durant la meua estància, incloent metges adjunts, residents, infermeres, auxiliars i administratives, perquè van crear la meua llar en el món hospitalari i perquè em van ensenyar la meua professió: la Dermatologia.



La presente Tesis Doctoral se estructura en base a 3 proyectos de investigación propios, fruto de los cuáles, se han realizado 4 publicaciones en revistas científicas indexadas con *impact factor* tal y como exige el Programa de Doctorado 'Medicina e Investigación Translacional', y que se exponen en los Anexos.

La enfermedad objeto de estudio es la Psoriasis, y la hipótesis e hilo conductor que subyace en ella, defiende que cambios funcionales en los receptores y mecanismos del sistema inmunitario explican la variabilidad en cuanto a susceptibilidad, expresión de la enfermedad y respuesta al tratamiento que observamos en nuestros pacientes en la práctica clínica.

Para contrastar nuestra hipótesis, hemos seleccionado 3 familias de receptores en base a la inmunopatogenia de la enfermedad y experiencia del grupo investigador en anteriores trabajos, y, basándonos en el análisis de polimorfismos genéticos, se han realizado los distintos estudios que se incluyen en esta Tesis Doctoral.

Además, el grupo investigador ha replicado un modelo murino de psoriasis inducido por imiquimod, ampliamente aceptado en la comunidad científica, para el estudio específico del receptor linfocítico CD6 en la respuesta inmunitaria adaptativa propia de la Psoriasis.

Por ello, esta obra constituye un ejemplo de Investigación Translacional en la que, el clínico, ante la realidad de su experiencia en práctica clínica, plantea una hipótesis y diseña y ejecuta un proyecto de investigación para contrastarla.



<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>1. Psoriasis.....</b>	<b>13</b>
1.1. Introducción .....	13
1.2. Epidemiología.....	14
1.3. Cronicidad de la enfermedad e impacto en la calidad de vida.....	14
1.4. Clínica.....	15
1.5. Histopatología.....	20
1.6. Factores desencadenantes .....	21
1.7. Genética .....	21
1.8. Fisiopatogenia.....	25
1.8.1. Fisiología de la piel.....	25
1.8.2. Psoriasis como alteración de la respuesta fisiológica cutánea.....	28
1.8.3. Mecanismos inmunológicos subyacentes en la Psoriasis .....	29
1.9. Tratamiento .....	36
1.9.1. Fototerapia.....	37
1.9.2. Fármacos biológicos .....	37
<b>2. Receptores <i>toll</i>-like y patología inmunomediada.....</b>	<b>43</b>
2.1. Introducción.....	43
2.2. TLRs: estructura molecular y sus ligandos.....	44
2.3. Localización de TLRs, tráfico intracelular e implicaciones funcionales.....	45
2.4. Vías efectoras desencadenadas por los TLRs.....	48
2.5. Ligandos endógenos de los TLRs.....	50
2.6. TLRs en Psoriasis .....	52
2.7. Polimorfismos de <i>TLRs</i> en patología infecciosa e inflamatoria .....	56
<b>3. Receptores linfocitarios CD5 y CD6 y patología inmunomediada.....</b>	<b>59</b>
3.1. Introducción.....	59
3.2. Receptor linfocitario CD5.....	60

## ÍNDICE

3.2.1.	Estructura, expresión y ligandos de CD5.....	60
3.2.2.	Funciones inmunológicas de CD5.....	62
3.2.3.	Impacto de CD5 en patología inmunomediada.....	66
3.2.4.	Polimorfismos de CD5 en la enfermedad inmunomediada.....	67
3.2.5.	Terapias inmunodirigidas y CD5 en patología inmunomediada y oncológica.....	68
3.3.	Receptor linfocítico CD6.....	69
3.3.1.	Estructura, expresión y ligandos de CD6.....	69
3.3.2.	Funciones inmunológicas de CD6.....	72
3.3.3.	CD6 en las enfermedades inmunomediadas.....	76
3.3.4.	Evidencia experimental de CD6 en patología inmunomediada.....	76
3.3.5.	Polimorfismo de CD6 en patología inmunomediada.....	78
3.3.6.	Terapias inmunodirigidas y CD6 en patología inmunomediada.....	79
<b>4.</b>	<b>Receptores Fc<math>\gamma</math> y tratamiento biológico anti-TNF-<math>\alpha</math> en Psoriasis.....</b>	<b>83</b>
4.1.	Introducción.....	83
4.2.	Familia de los Fc $\gamma$ Rs.....	84
4.3.	Estructura molecular de los Fc $\gamma$ Rs.....	85
4.4.	Presencia de los Fc $\gamma$ Rs en el SI.....	86
4.5.	Espectro de afinidad de los Fc $\gamma$ Rs por la IgG.....	86
4.6.	Factores adicionales que modulan la unión IgG-Fc $\gamma$ R.....	87
4.6.1.	Mediadores que regulan la expresión de Fc $\gamma$ R.....	88
4.6.2.	Glicovariantes de IgG que modulan la unión a Fc $\gamma$ R.....	88
4.7.	Funciones inmunológicas inducidas por Fc $\gamma$ R.....	89
4.7.1.	Funciones eferentes.....	89
4.7.2.	Funciones aferentes.....	90
4.8.	Polimorfismos genéticos de <i>FCGRs</i> .....	91
4.8.1.	<i>FCGR1A-H131R</i> (rs1801274).....	91
4.8.2.	<i>FCGR3A-V158F</i> (rs396991).....	92
4.8.3.	Relevancia clínica de los polimorfismos de <i>FCGRs</i> en patología autoinmunitaria.....	92
4.9.	<i>FCGRs</i> como marcadores farmacogenéticos.....	95

4.9.1. Polimorfismos <i>FCGRs</i> en el tratamiento biológico de patología neoplásica .....	96
4.9.2. Polimorfismos <i>FCGRs</i> en el tratamiento biológico de patología inflamatoria.....	98
<b>II. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>103</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>107</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>111</b>
<b>1. Polimorfismos genéticos de los <i>TLRs</i> como factores de susceptibilidad y modificadores de la enfermedad en Psoriasis.....</b>	<b>113</b>
1.1. Población a estudio .....	113
1.2. Estudio genético.....	115
1.2.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	115
1.2.2. Linkage disequilibrium.....	116
1.3. <i>TLR9</i> rs5743836 como factor genético de susceptibilidad en la Psoriasis .....	117
1.4. Polimorfismos genéticos de <i>TLRs</i> como factores modificadores de la Psoriasis. ....	117
<b>2. Polimorfismos de los <i>TLRs</i> y respuesta al tratamiento con UVBnb en Psoriasis. .</b>	<b>121</b>
<b>3. Evidencias genéticas y experimentales del papel del receptor linfocítico CD6 en la Psoriasis.....</b>	<b>124</b>
3.1. Población a estudio .....	124
3.2. Estudio genético.....	124
3.3. Impacto de CD6 en la gravedad de la Psoriasis.....	126
3.4. Impacto de CD6 en la edad de debut de la Psoriasis .....	129
3.5. Estudio experimental sobre el papel de CD6 en un modelo murino de Psoriasis inducido por IMQ.....	130
3.6. Estudio <i>in vitro</i> de la influencia de CD6 en la polarización de células T naïve .....	131
<b>4. Polimorfismos de los <i>FcRγ</i> en el tratamiento biológico de la Psoriasis. ....</b>	<b>133</b>
4.1. Población a estudio .....	133
4.2. Estudio genético.....	136
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>145</b>

## ÍNDICE

<b>1. Polimorfismos de <i>TLRs</i> como factor de susceptibilidad y modificador de la enfermedad psoriásica.</b> .....	<b>145</b>
<b>2. Polimorfismos de <i>TLRs</i> y respuesta al tratamiento con UVBnb.</b> .....	<b>150</b>
<b>3. Papel del receptor linfocítico CD6 en la enfermedad psoriásica</b> .....	<b>153</b>
3.1. Evidencia genética del receptor linfocítico CD6 en Psoriasis. ....	153
3.2. Evidencia experimental <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> del papel del receptor linfocítico CD6 en un modelo murino de Psoriasis .....	157
<b>4. Polimorfismos <i>FCGR2A</i> y <i>FCGR3A</i> en la respuesta al tratamiento biológico anti-TNF-<math>\alpha</math> en Psoriasis.</b> .....	<b>159</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>169</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>173</b>
<b>VIII. ANEXO I</b> .....	<b>207</b>
Artículo original nº 1 “ <b>Genetically defined variants of toll-like receptors 3, 7 and 9 as phenotype and risk modifier factors for Psoriasis.</b> ” .....	209
Artículo original nº 2 “ <b><i>Toll</i>-like receptor 9 promoter polymorphism as a predictive factor of narrow-band UVBphototherapy response in patients with Psoriasis</b> ”.....	215
Artículo original nº 3 “ <b>Genetic and experimental evidence for the involvement of the CD6 lymphocyte receptor in Psoriasis</b> ”. ....	223
Artículo original nº 4 “ <b>The role of Fc<math>\gamma</math> receptor polymorphisms in the response to anti-tumor necrosis factor therapy in Psoriasis: A pharmacogenetic study</b> ”. ....	235
<b>IX. ANEXO II</b> .....	<b>243</b>
<b>1. Relación de contribuciones realizadas por el doctorando relacionadas con la Tesis Doctoral</b> .....	<b>243</b>

## **ABREVIATURAS**

---



**ABREVIATURAS**

- ACH = Acrodermatitis continua de Hallopeau  
AcMo = Anticuerpo monoclonal  
Acs = Anticuerpos  
ADA = Anticuerpo anti-fármaco  
ADCC = Citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpo  
AhR = Receptor aryl hidrocarburo  
AICD = *Activated induced death cell*  
ALCAM = *Activated Leukocyte Cell Adhesión Molecule*  
AMP = Péptido antimicrobiano  
APC = Célula presentadora de antígeno  
APs = Artritis psoriásica  
AR = Artritis reumatoide  
B reg = Células B reguladora  
BCR = Receptor clonotípico de las células B  
BSA = *Body Surface Area*  
CAL = Calcipotriol  
CARD14 = *Caspase recruitment domain family membre14*  
CCL = *C-C motif chemokine ligand*  
CCR = Cáncer colorectal  
CDC = Citotoxicidad dependiente del complemento  
cGvHD = Enfermedad crónica de injerto contra huésped  
CIA = *Collagen-Induced Arthritis*  
CLR = *C-type lectin receptor*  
CM = Cáncer de mama  
CsA = Ciclosporina A  
CXCL = *Chemokien C-X-C motif ligand*  
DAMP = *Damage-associated molecular patterns*  
DC = Células dendrítica  
DLQI = *Dermatology Quality of Life Index*  
DM = Diabetes Mellitus

## ABREVIATURAS

DNA = Ácido desoxiribonucleico  
EA = Espondilitis anquilosante  
EAE = Modelo experimental de encefalitis autoinmunitario  
EB = Enfermedad de Beçhet  
EC = Enfermedad de Crohn  
ECM = Matriz extracelular  
EDC = *Epidermal differentiation cluster*  
EII = Enfermedad inflamatoria intestinal  
EM = Esclerosis múltiples  
F = Fenilalanina  
Fab = Fragmento de unión al antígeno  
Fc = Fragmento constante (o cristalizable)  
*FCGR* = Gen del receptor de la fracción constante de la IgG  
FcRn = Receptores Fc-neonatales  
FcaR = Receptor Fc-alfa  
Fcγ = Región Fc de IgG  
FcγR = Receptor Fc-gamma  
FceR = Receptor Fc-epsilon  
γc = Cadena gamma común  
G-CSF = Factor estimulador de colonias de granulocitos  
GST = Glutathine-S-transferasa  
*GWAS* = *Genome-wide association studies*  
H = Histidina  
HLA = Antígeno leucocitario humano  
*HMBG1* = *High-mobility group box1*  
*HSP* = *Heat shock proteins*  
HWE = Equilibrio de Hardy-Weinberg  
IC = Inmunocomplejo  
IgG = Inmunoglobulina G  
IL = Interleucina  
INF = Interferón  
ITAM = Motivos activadores basados en tirosina  
ITIM = Motivos inhibidores basados en tirosina

LAT = *Linker of activation of T cells*  
 LD = *Linkage disequilibrium*  
 LNH = Linfoma No-Hodgkin  
 LPS = Lipopolisacárido  
 LRR = Repeticiones ricas en leucina  
 LTA = Ácido lipoteico  
 MAPK = *Mitogen-activated protein kinasas*  
 MCR1 = Receptor 1 de la melanocortina  
 mDC = Célula dendrítica mieloide  
 MGC = Complejo mayor de histocompatibilidad  
 MTX = Metotrexate  
 NF-κB = Factor nuclear κB  
 NK = Natural killer  
 NLR = *NOD-like receptor*  
 PAMP = *Pathogen associated molecular pattern*  
 PASI = *Psoriasis Area and Severity Index*  
 pDC = Células dendrítica plasmocitoide  
 PGN = Peptidoglicanos  
 PPG = Psoriasis pustulosa generalizada  
 PPP = Pustulosis palmoplantar  
 PRR = Receptores de reconocimiento de patrones  
 PSORS = *Psoriasis susceptibility*  
 PUVA = Psoralenos + UVA  
 PV = Psoriasis vulgar  
 R = Arginina  
 RE = Retículo endoplasmático  
 RLR = *Retinoic acid-inducible gene-1-like receptor*  
 RNA = Ácido ribonucleico  
 ROR = Receptor huérfano del retinoide  
 sCD5 = Forma soluble de CD5  
 SD = Desviación estándar  
 SF-SRRCR = Receptores tipo *scavenger* ricos en cisteína  
 SI = Sistema Inmunitario

## ABREVIATURAS

SIRS = Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SNP = *Single nucleotide polymorphism*

SRE = Sistema retículo-endotelial

SS = Síndrome de Sjögren

sTNF- $\alpha$  = TNF- $\alpha$  soluble

T reg = Célula T reguladora

TCR = Receptor clonotípico de las células T

TGF = *Transforming growth factor*

TIR = Receptor IL-1/*Toll*

TLR = Receptor *toll-like*

tmTNF- $\alpha$  = TNF- $\alpha$  unido a membrana

TNF = Factor necrosis tumoral

TNFR = Receptor de TNF- $\alpha$

UVA = Ultravioleta A

UVB = Ultravioleta B

UVBnb = *UVB narrow band* (UVB de banda estrecha)

V = Valina

VDR = Receptor de la vitamina D

VEGF = Factor de crecimiento del endotelio vascular

VIH = Virus de la inmunodeficiencia humana

# INTRODUCCIÓN

---



# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Psoriasis

### 1.1. Introducción

La Psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de gran prevalencia en nuestra población que se presenta típicamente con placas eritemato-descamativas en cuero cabelludo y zonas de extensión, si bien las manifestaciones clínicas de la enfermedad son muy variadas.<sup>1</sup> Entendida inicialmente como una enfermedad puramente cutánea del queratinocito, la fisiopatogenia de la enfermedad ha experimentado una gran evolución a lo largo del siglo pasado. A finales de los años 70, el descubrimiento de la ciclosporina A (CsA) como tratamiento inmunosupresor altamente eficaz en Psoriasis puso de manifiesto la gran importancia del Sistema Inmunitario (SI) (y en particular la célula T) en la fisiopatogenia de la enfermedad.<sup>2</sup> Ya en el siglo XXI, el desarrollo de la Genética y la Inmunología junto con la irrupción de los fármacos biológicos revolucionaron el tratamiento de la Psoriasis y permitieron la descripción tanto de las células implicadas como de las interleucinas (ILs), citocinas y mediadores inmunológicos que subyacen tras el fenómeno inflamatorio de la enfermedad.<sup>3</sup> En la actualidad, la Psoriasis se considera una enfermedad inflamatoria multifactorial mediada por células T con un fuerte componente genético resultado de la interacción entre múltiples alelos de susceptibilidad y factores ambientales desencadenantes.<sup>4</sup>

Paralelamente, la Psoriasis ha traspasado su condición de enfermedad puramente “cutánea” y se ha relacionado con otras enfermedades inflamatorias reumatológicas y otros procesos de índole cardiovascular y endocrinológico, como la Artritis Psoriásica (APs), la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), el Infarto Agudo de Miocardio y el Síndrome Metabólico, sin olvidar su importante influencia en la esfera neuro-psicológica del paciente.<sup>5-8</sup>

Actualmente, la Psoriasis es una de las enfermedades cutáneas más estudiadas tanto desde un punto de vista clínico, inmunológico, como farmacológico, y las publicaciones

## INTRODUCCIÓN

científicas en relación a la enfermedad crecen exponencialmente. En los Servicio de Dermatología existen Unidades Especializadas en Psoriasis, y se invierte un gran esfuerzo humano y económico en el abordaje y tratamiento integral del paciente.

### **1.2. Epidemiología**

Se estima que entre un 1-3% de la población mundial está afectada de Psoriasis. Entre los factores más importantes que modifican la prevalencia se incluyen la edad, la geografía y el grupo étnico, que probablemente definan factores ambientales y genéticos, respectivamente. Así, la prevalencia es más alta en adultos, en climas fríos y poco soleados y en la raza caucásica.<sup>9</sup> En nuestro ámbito, los datos más recientes indican que el 2,3% de la población española presenta Psoriasis<sup>10</sup>. Los estudios describen una incidencia de distribución bimodal con un primer pico a los 18-39 años y otro a los 50-69 años.<sup>9</sup> No existe predilección por ningún género si bien los varones suelen presentar formas más severas.<sup>11</sup> Los estudio epidemiológicos han demostrado la asociación con otros procesos inflamatorios sistémicos de etiología común como la APs, la Enfermedad de Crohn (EC), y con otros procesos de distinta naturaleza como la enfermedad cardiovascular, el síndrome metabólico, la esteatosis hepática no-alcohólica, trastornos ansioso-depresivos, linfoma y una mayor prevalencia de tabaquismo y enolismo.<sup>7</sup> Incluso, algunos estudios sugieren una menor esperanza de vida en pacientes con Psoriasis incluso tras la corrección de los factores clásicos de mortalidad, siendo 3,5 y 4,4 años menor en hombres y mujeres, respectivamente.<sup>12</sup>

### **1.3. Cronicidad de la enfermedad e impacto en la calidad de vida**

En la última década, múltiples estudios han puesto de manifiesto el gran impacto psicológico y en la calidad de vida de los pacientes con Psoriasis que, de algún modo, parecen condenados a vivir eternamente con la enfermedad. Para ello, se han utilizado cuestionarios comunes a otras enfermedades (p.e. SF-36) y específicos para enfermedades dermatológicas (p.e. DLQI) que valoran desde un punto de vista físico, social, psicológico y cognitivo el impacto de la enfermedad en la vida de los pacientes. La visibilidad de las lesiones cutáneas produce rechazo social y un profundo impacto psicológico en el paciente, incluso mayor que otras enfermedades consideradas más graves como el cáncer, el infarto

de miocardio o la insuficiencia cardíaca.<sup>6</sup> La afectación de determinadas áreas anatómicas visibles (p.e. dorso de manos, cara), la afectación incapacitante en palmas, plantas o región genital, y la sintomatología asociada a las placas en forma de prurito, dolor, sangrado y descamación explican en gran parte este importante impacto en el paciente. Además, la presencia de comorbilidades como la APs, el síndrome metabólico o la enfermedad cardiovascular empeora aún más la calidad de vida de los pacientes.<sup>13</sup>

#### 1.4. Clínica

La Psoriasis presenta un amplio espectro clínico con 4 formas reconocidas en las que se incluyen la Psoriasis vulgar (PV), la Psoriasis en gotas (o Psoriasis guttata), la Psoriasis pustulosa y la eritrodermia psoriásica, y si bien un paciente suele presentar una forma predominante de Psoriasis, éstas pueden coexistir en menor o mayor grado. Todas ellas presentan los signos característicos de la enfermedad: eritema, infiltración y descamación. Estos signos clínicos son reflejo de los cambios histopatológicos observados en forma de capilares dilatados en las papilas dérmicas, acantosis epidérmica e infiltrado inflamatorio, y paraqueratosis.<sup>4</sup>

La PV es la forma más frecuente. Afecta al 90% de los casos y se caracteriza por la presencia de placas eritematosas bien delimitadas cubiertas por escamas blancas y adherentes. Estas placas redondas u ovaladas pueden ser de pequeño tamaño o cubrir grandes extensiones del cuerpo, y pueden afectar cualquier parte del tegumento cutáneo si bien muestra predilección por el cuero cabelludo y zonas de extensión de piernas y antebrazos (incluyendo codos y rodillas), la región lumbar, la región periumbilical y el pliegue retroauricular. Algunos pacientes cursan a brotes presentando fases más inflamatorias e inestables de la enfermedad; otros pacientes presentan afectación cutánea más persistente con placas menos inflamatorias pero más hiperqueratósicas (ver **figura 1**). El fenómeno isomórfico de Koebner, mediante el cual se induce la aparición de la enfermedad tras un traumatismo en la piel, provoca la aparición de lesiones de configuración geométrica. El término *sebopsoriasis* se reserva para aquellos cuadros clínicos con características mixtas entre Psoriasis y Dermatitis Seborreica, y suele afectar el cuero cabelludo, la cara y la región pre-esternal.

## INTRODUCCIÓN



**Figura 1.** Manifestaciones clínicas de la Psoriasis vulgar; a) placas eritematodescamativas bien delimitadas con escama blanca adherente en zonas de extensión y onicodistrofia en fase estable de la enfermedad; b) placas eritematosas extensas en tronco y extremidades inferiores en una fase más inflamatoria de la enfermedad.

Existen localizaciones especiales que confieren a la PV características clínicas propias como la afectación del cuero cabelludo, la ungueal, la palmo-plantar y la flexural. La afectación del cuero cabelludo ocurre en el 75-90% de los casos y puede asociarse a una alopecia no cicatricial.<sup>13</sup> La afectación ungueal se observa en el 50% de los pacientes en el momento del diagnóstico y hasta en el 90% de los pacientes con APs.<sup>14,15</sup> Esta afectación se manifiesta típicamente en forma de *pitting* o ‘mancha en aceite’ y puede progresar a un engrosamiento del plato ungueal, a la onicolisis por la intensa hiperqueratosis subungueal o a la completa destrucción de la uña. La afectación de los pliegues cutáneos se denomina Psoriasis inversa y suele presentarse en las axilas, la región inguinal, el pliegue interglúteo y los pliegues submamarios. Su localización condiciona una mayor fricción y humedad local por lo que suele presentarse en forma de placas asalmonadas bien delimitadas sin escamas plateadas asociadas o no a otras placas de PV en zonas de extensión.<sup>13</sup>



**Figura 2.** Onicodistrofia psoriásica en forma de a) mancha en aceite, pitting y b) hiperqueratosis subungueal; c) Psoriasis inversa: placas bien delimitadas, asalmonadas y sin apenas descamación en pliegue submamario.

La PV es especialmente crónica y, si bien algunos pacientes cursan a brotes con periodos intercríticos sin clínica cutánea, la gran mayoría presenta sintomatología persistente con exacerbaciones y remisiones parciales a lo largo de su vida. Los avances en genética han posibilitado una nueva clasificación de la PV definida por la presencia del antígeno leucocitario humano (HLA)-Cw6 (el factor genético de susceptibilidad más relevante en Psoriasis), la gravedad y la edad de debut de la enfermedad. Según esta clasificación, los

## INTRODUCCIÓN

pacientes con Psoriasis *tipo I* presentan un debut de la enfermedad más precoz, formas más graves de psoriasis y una mayor prevalencia de HLA-Cw6 en comparación con los pacientes con psoriasis *tipo II*.<sup>16,17</sup>

La Psoriasis en gotas es una forma eruptiva de la enfermedad típicamente desencadenada por la infección faringoamigdalal por *Streptococcus pyogenes* en pacientes pediátricos y adultos jóvenes. Clínicamente se caracteriza por la aparición súbita de múltiples pápulas redondas eritemato-descamativas en forma de gotas distribuidas por todo el tegumento cutáneo con especial predilección por el tronco y extremidades, de modo que el paciente parece ‘salpicado’ por la lluvia. Aproximadamente un tercio de los pacientes con Psoriasis Guttata acaban presentando PV en la edad adulta.<sup>13</sup>

Las formas pustulosas se caracterizan por la presencia de pústulas estériles sobre placas psoriásicas eritematosas. La Psoriasis pustulosa generalizada (PPG) es una forma infrecuente que, tal y como su nombre indica, se presenta con placas eritematosas diseminadas con múltiples pústulas que a menudo coalescen en grandes lagos de pus. En su forma más inflamatoria (tipo von Zumbusch) estas lesiones pueden progresar rápidamente, producir fiebre, alteración del estado general y poner en riesgo la vida del paciente. Su forma anular se caracteriza por placas anulares de crecimiento centrifugo con descamación y pústulas en el borde de avance.

La PPG puede aparecer tanto en pacientes previamente afectados de PV como en pacientes sin historia previa de Psoriasis. En los primeros, los factores desencadenantes mejor descritos para el desarrollo de una forma pustulosa incluyen el embarazo, la suspensión repentina de corticoides u otro tratamientos sistémicos, infecciones, hipocalcemia e irritantes. Probablemente, estos pacientes presentan una forma aguda muy inflamatoria de una PV que se asocia a mutaciones con ganancia de función en *CARD14* (*casapase recruitment domain family member 14*).<sup>18</sup> Por otro lado, las formas *puras* de PPG sin historia previa de PV y a menudo asociada a mayor afectación sistémica responden a otro mecanismo inflamatorio y se asocian a mutaciones recesivas en el gen *IL-36RN* que condiciona una mayor producción de IL-8 y una respuesta exagerada a IL-1 $\beta$ .<sup>19</sup>

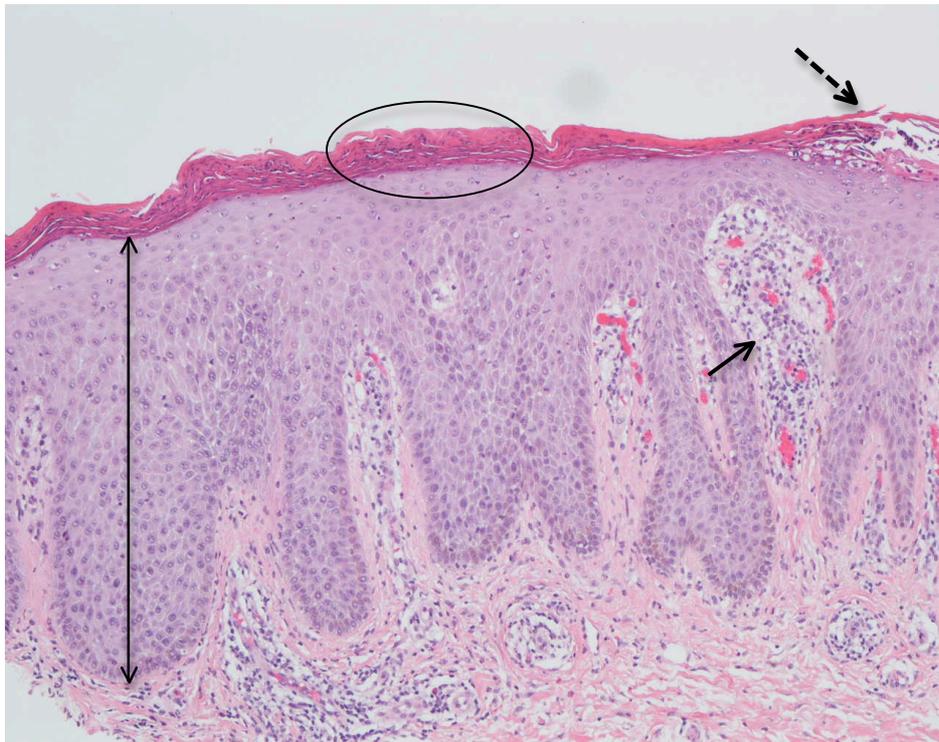
Existen también formas localizadas de Psoriasis pustulosa; la Pustulosis Palmoplantar (PPP) y la Acrodermatitis Continua de Hallopeau (ACH). La primera afecta palmas y plantas en forma de placas eritemato-descamativas con pústulas y, si bien se ha discutido su relación con la Psoriasis, existen evidencias epidemiológicas, clínicas y fisiopatogénicas que apoyan su inclusión en una misma entidad patológica.<sup>20</sup> La ACH es una presentación rara pero muy característica de Psoriasis en la que aparecen pústulas en la parte distal de los dedos de las manos y ocasionalmente de los pies. Estas pústulas evolucionan a costra y descamación y, a menudo, conllevan la destrucción y pérdida de la uña. Hasta el 20% de pacientes con estas formas de Psoriasis pustulosa localizada presentan mutaciones en *IL36RN*.<sup>21</sup>

La gravedad clínica de la Psoriasis viene determinada por su extensión e intensidad así como del área afectada y la existencia de síntomas sistémicos (p.e. artritis o alteración temperatura y labilidad vasomotora en la eritrodermia psoriásica). Existen distintos índices y parámetros valoran la gravedad clínica de la Psoriasis. Los más extendidos y aceptados son el *Psoriasis Area and Severity Index* (PASI), el *Body Surface Area* (BSA) y el cuestionario de calidad de vida *Dermatology Quality of Life Index* (DLQI). El PASI valora la extensión de la enfermedad, y las características clínicas de las placas, incluyendo eritema, infiltración y descamación. El BSA valora exclusivamente la extensión de la enfermedad. Finalmente, el DLQI valora el impacto en la calidad de vida del paciente con una enfermedad cutánea, como la psoriasis. Por consenso, la psoriasis moderada-grave se define como aquella con índices PASI y/o BSA y/o DLQI >10, si bien esta definición no contempla formas de Psoriasis que afectan regiones anatómicas especialmente relevantes como las manos, la cara o la región genital, ni la presencia de onicodistrofia o las formas pustulosas de la enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

### 1.5. Histopatología

Los hallazgos histopatológicos ayudan a explicar el aspecto clínico de las placas psoriasicas. La epidermis muestra alteraciones en forma de acantosis (engrosamiento de los estratos epidérmicos viables), hiperqueratosis (engrosamiento del estrato córneo), paraqueratosis (persistencia de formas nucleares en el estrato córneo) y pérdida de la capa granulosa; todo ello reflejo de una hiperproliferación, maduración precoz e incompleta cornificación del queratinocito. La elongación regular de las crestas epidérmicas (papilomatosis) se acompaña de unas papilas dérmicas alargadas que albergan capilares dilatados y tortuosos. El infiltrado inflamatorio es prominente y se compone principalmente de linfocitos CD4+ y células dendríticas (DCs) en la dermis, y linfocitos CD8+ y neutrófilos en la epidermis, formando los llamados microabscesos de Munro en el estrato córneo y las pústulas espongiiformes de Kogoj en el estrato espinoso, respectivamente.<sup>22</sup> Estos hallazgos patológicos explican el engrosamiento, el eritema y la descamación característica de la placa de psoriasis.



**Figura 3.** Cambios histológicos en Psoriasis vulgaris. En la epidermis, se observa una acantosis regular (flecha doble cabeza) con hiperqueratosis y paraqueratosis (círculo), y presencia de polimorfonucleares en el estrato córneo (flecha intermitente). En las papilas dérmicas, existe una hiperplasia endotelial con capilares tortuosos (flecha corta) y un infiltrado mononuclear que se distribuyen principalmente alrededor de los vasos y en los procesos papilares.

### 1.6. Factores desencadenantes

La existencia de determinados factores ambientales como desencadenantes y exacerbantes de la enfermedad es bien reconocido en Psoriasis. Entre ellos se incluyen el estrés, el trauma mecánico (fenómeno isomórfico de Koebner), la infección (especialmente la estreptocócica), determinados fármacos (litio,  $\beta$ -bloqueantes, antimaláricos e interferón), la obesidad, el alcohol y el tabaco.<sup>23</sup> Sin embargo, las vías fisiopatogénicas por las que estos factores ambientales actúan es poco conocida. En realidad, existen pocos estudios que expliquen la relación entre estos factores ambientales y la enfermedad, e incluso algunos autores cuestionan su papel etiopatogénico.<sup>24</sup> De todos ellos, el mejor estudiado es la infección estreptocócica que ha sido relacionada con la activación de las vías inflamatorias de la Psoriasis y el mayor determinante genético de la enfermedad, el HLA-Cw6.<sup>25</sup> Otro factor desencadenante bien estudiado es el fenómeno isomórfico de Koebner en el que tras un traumatismo mecánico, los mecanismos inflamatorios de reparación cutáneos alterados en pacientes genéticamente determinados conducen a la aparición de lesiones psoriasicas.<sup>26</sup>

### 1.7. Genética

La Psoriasis está considerada una enfermedad multifactorial en la que interaccionan distintos factores ambientales (anteriormente citados) con un fuerte componente genético ampliamente poligénico. En los años 60, estudios poblacionales y familiares pusieron de manifiesto la alta incidencia familiar de la enfermedad.<sup>3</sup> Además, otros estudios mostraron una mayor concordancia en la prevalencia de Psoriasis en gemelos (35-70%) en comparación con los mellizos (12-20%). La falta de concordancia absoluta entre gemelos y un patrón hereditario no definido sugirieron una etiología multifactorial en la que probablemente no sólo estaban implicados distintos genes sino que factores ambientales también parecían contribuir en la aparición de la enfermedad.<sup>27</sup> Desde entonces, el conocimiento de la genética ha experimentado un gran desarrollo y, gracias a los estudios de asociación de genes específicos y a los más amplios y recién desarrollados estudios GWAS (*genome-wide association studies*), se han identificado múltiples genes y *loci* asociados a la enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

Los primeros estudio genéticos se basaban en el análisis de asociación que permiten localizar genes asociados a la enfermedad en una región concreta del cromosoma. De este modo, se identificaron 9 *loci* asociados denominados ‘*Psoriasis Susceptibility (PSORS)1-9*’.<sup>28</sup> El primero de ellos, PSORS1, ha sido validado en todos los estudios genéticos y es considerado el mayor determinante genético de la enfermedad. PSORS1 reside en la región del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en el brazo corto del cromosoma 6. Posteriores estudios de mapeo, secuenciación y haplotipos identificaron al alelo *HLA-Cw6* como el asociado a la enfermedad.<sup>29</sup> En efecto, aproximadamente el 60% de los pacientes caucásicos con Psoriasis son portadores de *HLA-Cw6* y se estima un riesgo relativo x10 para los portadores y x20 para los homocigotos.<sup>30</sup>

Pese a toda la evidencia genética existente, los mecanismos por los que *HLA-Cw6* promueve la Psoriasis no están bien definidos. *HLA-C* es un gen del MHC tipo I que se expresa en prácticamente todas las células del organismo y sirve para presentar péptidos extraños intracelulares a las células del SI. En Psoriasis, este receptor es utilizado tanto por las DCs como por los queratinocitos para presentar antígenos a las células CD8+ y natural killer (NK), respectivamente. Teniendo en cuenta este hecho, una mayor afinidad de *HLA-Cw6* para los autoantígenos de la enfermedad podría explicar la estrecha relación entre Psoriasis y *HLA-Cw6*. En este sentido, estudios de biología estructural han demostrado que *HLA-Cw6* tiene una gran afinidad para LL37<sup>31</sup>, péptido antimicrobiano (AMP) identificado como autoantígeno para células T en Psoriasis.<sup>32</sup> Otro autoantígeno descrito es ADAMTSL5, molécula presente en los melanocíticos y presentado de manera específica por *HLA-Cw6* a las células CD8+.<sup>33,34</sup> Cabe destacar que tanto LL37 como ADAMTSL5 están aumentados en las placas psoriasicas e íntimamente relacionados con las DCs, los macrófagos y las células T en las biopsias de piel afecta.<sup>35</sup> Otros autores proponen como autoantígeno en Psoriasis la queratina 17 que guarda gran similitud con la proteína M estreptocócica.<sup>36</sup> Esta hipótesis explicaría la aparición de Psoriasis Guttata y las exacerbaciones de PV en relación a las infecciones faringoamigdalares estreptocócicas. Finalmente, el locus HLA-C es muy polimórfico y se han descrito alelos en la región reguladora asociados a la enfermedad de modo que una mayor expresión del receptor podría condicionar un mayor riesgo de enfermedad.<sup>37</sup>

El *HLA-Cw6* solo explica poco más del 40% de los casos familiares de Psoriasis, por lo que existen muchos otros genes fuera del MHC asociados a la enfermedad y a sus distintos fenotipos. Entre los PSORS inicialmente identificados, sólo algunos de ellos han sido validados por los más modernos y potentes estudio genéticos. Gracias a las nuevas técnicas de secuenciación, *CARD14* ha sido identificado como el gen asociado a PSORS2. Este gen se ha asociado a Psoriasis y a otros dos procesos dermatológicos similares; la Pitiriasis Rubra Pilaris y la PPG con PV pre-existente.<sup>18</sup> *CARD14* se expresa intensamente en los queratinocitos y está implicado en la vía de transducción del factor nuclear kB (NF-kB). Así, mutaciones con ganancia de función en *CARD14* favorecen la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias como *C-C motif chemokine ligand* (CCL) 20, IL-8 e IL-36 propias del SI innato y la aparición de psoriasis en la piel.<sup>22</sup> Este gen presenta distintos polimorfismos, algunos poco frecuentes y de alta penetrancia, otros más comunes pero de menor impacto.<sup>38</sup> El espectro clínico asociado a *CARD14* es amplio e incluye desde formas leves de PV hasta formas pustulosas generalizadas tipo PPG. El cuadro fenotípico depende del tipo y número de mutaciones en *CARD14* así como la interacción con otros genes y factores ambientales.<sup>39</sup> El papel fisiopatogénico de *CARD14* en PV ha sido demostrado en un modelo experimental murino de psoriasis.<sup>40</sup>

PSORS4 localizado en el cromosoma 1q21 abarca un grupo de más de 60 genes relacionados con la diferenciación queratinocítica (*Epidermal Differentiation Cluster* EDC), un segmento genómico altamente conservado relacionado con la diferenciación terminal del queratinocito.<sup>41</sup> Estudios posteriores han demostrado que la delección de dos genes del EDC (*LCE3B* y *LCE3C* que codifican dos proteínas clave para el proceso de corneoficación tardío) está intensamente asociada a Psoriasis, sugiriendo un papel fisiopatogénico relevante para la alteración de la barrera cutánea.<sup>42,43</sup>

Con el siglo XXI, llegaron grandes avances en el estudio del genoma humano gracias al importante desarrollo de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Estos avances permitieron el desarrollo de estudios GWAS en los que se analizan miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en grandes cohortes caso-control. El primer GWAS en Psoriasis se realizó en 2007; se analizaron 25.125 SNPs y se incluyeron 466 casos y 500 controles.<sup>44</sup> En los últimos años, se han realizado múltiples GWAS con un

## INTRODUCCIÓN

mayor número de participantes y SNPs analizados gracias a la colaboración internacional, el diseño metodológico y el continuo desarrollo tecnológico.<sup>45-49</sup> En el último meta-análisis realizado sobre estudios GWAS se incluyeron más de 9 millones de SNPs de 19.000 pacientes y 280.000 controles.<sup>50</sup> Otras técnicas de abordaje para el estudio genético también utilizadas con éxito en Psoriasis incluyen las plataformas de genotipación ImmunoChip y análisis del exoma completo (*whole-exome sequencing*).

Con estas técnicas, se han identificado un total de 63 *loci* de susceptibilidad para Psoriasis (47 en GWAS,<sup>45-49</sup> 15 en plataformas de genotipación ImmunoChip<sup>50,51</sup> y 1 en estudios de análisis del exoma<sup>52</sup>). Estos *loci* contienen genes implicados en la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa (concretamente genes relacionados con el eje IL-23/Th17, con la vía de señalización NF-kB y con el interferón (INF)), y genes implicados en el ECD.<sup>50</sup> Aún así, la identificación de estos *loci* solo explica un 30% más de la herencia de la enfermedad, por lo que se postula que otros muchos genes de menor impacto pero con efecto acumulativo indetectables en estudios tipo GWAS podrían contribuir en la aparición de la enfermedad.<sup>53</sup> Otro mecanismo genético potencialmente relevante en Psoriasis que también escaparía a la detección de los grandes estudios genéticos realizados sería la interacción gen-medio ambiente (epigenética).

En los últimos años, el uso de la secuenciación del exoma completo (*whole-exome sequencing*) ha permitido identificar cientos de genes asociados a enfermedades raras. En Psoriasis, esta técnica ha permitido identificar genes asociados a formas pustulosas poco frecuentes.<sup>28</sup> En 2011, dos grupos de investigadores independientes describieron por primera vez la ya mencionada asociación entre el gen *IL-36RN* y la PPG.<sup>19,54</sup> *IL-36RN*, también conocido como *IL-36 Receptor Antagonist*, está producido principalmente por los queratinocitos y bloquea IL-36 modulando así su efecto pro-inflamatorio. Mutaciones que confieren una pérdida de función de *IL-36RN* favorecen una actividad incontrolada de IL-36 y justifican la gran mayoría de casos de PPG sin PV asociada, un 20% de las ACH y una minoría de PPP.<sup>21</sup> Los pacientes con esta forma “pura” de PPG suelen presentar un debut precoz de la enfermedad, brotes de Psoriasis pustulosa asociados a síntomas sistémicos y lengua geográfica,<sup>55</sup> y por sus características clínicas y genéticas, algunos autores cuestionan su inclusión en la enfermedad psoriásica.

Pese al importante conocimiento acumulado en estos últimos años, aún quedan muchos aspectos genéticos por dilucidar en Psoriasis. Distintas estrategias pueden ser útiles para tal fin incluyendo el análisis genético de vías inmunológicas o el estudio de genes específicos relevantes en la fisiopatogéina de la enfermedad que puedan definir aspectos fenotípicos como *CARD14* y *IL36RN*. En esta Tesis Doctoral se presentan 4 trabajos en los que los genes a estudio han sido seleccionados en virtud de su función biológica teniendo en cuenta los aspectos inmunológicos y fisiopatogénicos de la Psoriasis, con el objetivo de estudiar su influencia en el riesgo a desarrollar la enfermedad, en definir su fenotipo y en la respuesta al tratamiento.

## 1.8. Fisiopatogenia

La Psoriasis puede entenderse como una alteración de los mecanismos fisiológicos determinados genéticamente que participan en la respuesta inflamatoria y reparativa de una piel dañada o agredida y que, en lugar de ser eficientes y autolimitados, se perpetúan en el tiempo dando lugar a las placas eritematosas, infiltradas y descamativas propias de la enfermedad.<sup>3</sup> Por ello, entender dichos mecanismos es de vital importancia para conocer la fisiopatogenia de la enfermedad.

### 1.8.1. Fisiología de la piel

La piel es la principal barrera entre el medio interno y el medio externo, y constituye la primera línea de defensa ante el trauma y la agresión.<sup>56</sup> La epidermis es la capa más superficial de la piel y está constituida por distintos estratos que aportan una **barrera física** e impermeable que evita la pérdida de agua al exterior y la penetración de microorganismos y cuerpos extraños al interior.<sup>57</sup> Esta barrera, que se renueva continuamente, es fruto de la diferenciación terminal del queratinocito en un proceso conocido como *cornificación* (ver **figura 4**).<sup>58</sup> Este proceso, altamente organizado tanto en tiempo como en espacio, se inicia en las capas basales de la epidermis y transcurre a lo largo de la migración del queratinocito que asciende por los distintos estratos epidérmicos (estrato espinoso y granular) hasta alcanzar la capa más externa, el estrato córneo.<sup>59</sup> A medida que asciende por los diferentes estratos, el queratinocito sintetiza y acumula

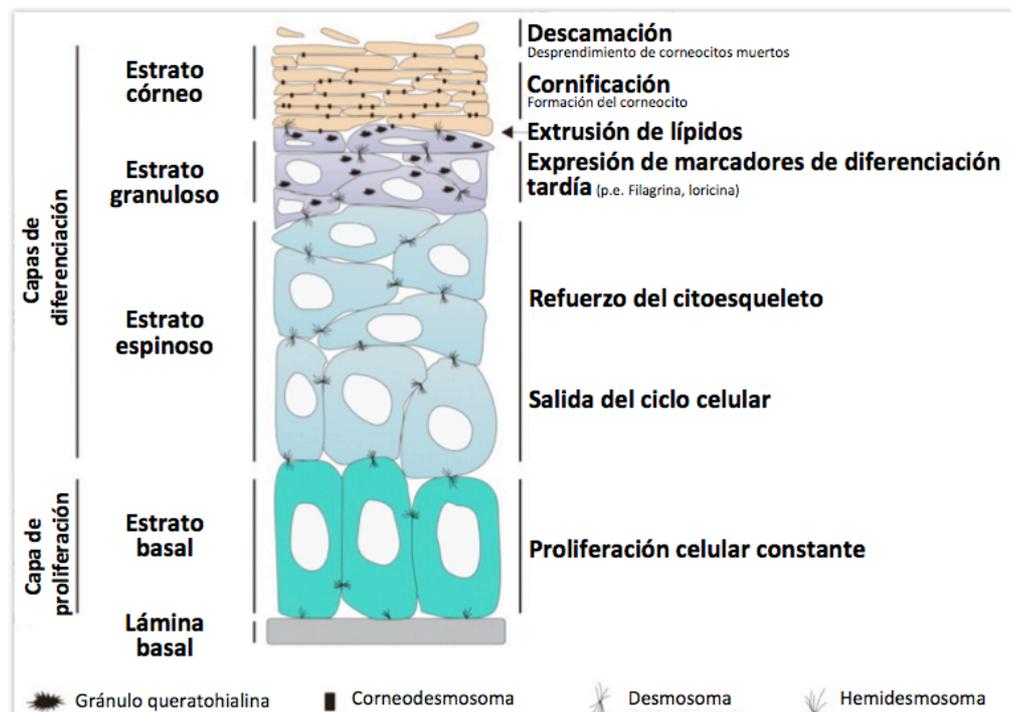
## INTRODUCCIÓN

distintas proteínas estructurales (p.e. queratina) y lípidos. Como resultado, el queratinocito queda embebido en un complejo proteico formado principalmente por queratina y filagrina que asfixia la célula provocando la pérdida del núcleo y su muerte celular. Esta estructura celular residual conocida como corneocito (o '*cornified envelope*') aporta resistencia e impermeabilidad a la piel. El tipo de proteínas sintetizadas por el queratinocito a lo largo de su maduración terminal varía en función de su localización anatómica (piel palmo-plantar, facial o resto del tegumento), del momento en el proceso de cornificación (estrato basal, espinoso o córneo) y de posibles condiciones patológicas (p.e. psoriasis).<sup>60</sup> Los lípidos excretados al exterior se depositan entre los corneocitos y forman un complejo magma lipídico que aporta cohesión y mayor impermeabilidad a la piel. Además, el queratinocito sintetiza distintas enzimas hidrolíticas y AMPs que junto con los lípidos, forman la **barrera bioquímica** y constituyen un primer mecanismo de defensa ante potenciales agresores.<sup>56</sup> Entre los AMPs se incluyen pequeñas proteínas de 12-50 aminoácidos tales como las defensinas, las catelicidinas (p.e. LL37) y las proteínas S100 (p.e. S100A7 o psoriasin). La correcta maduración del queratinocito en corneocito y la correcta síntesis de las distintas queratinas, lípidos, AMPs y enzimas que regulan la cornificación es de vital importancia para la correcta función de barrera físico-bioquímica de la piel.

En la piel sana, la *cornificación* transcurre a lo largo de 28 días, y la tasa proliferativa de la capa basal está compensada con la descamación del estrato córneo, de modo que la epidermis se regenera y descama continuamente manteniendo un perfecto equilibrio. Sin embargo, en Psoriasis, la tasa proliferativa del estrato basal está aumentada, el proceso de cornificación acelerado y la maduración del queratinocito incompleta; como resultado, los queratinocitos no pierden el núcleo, el estrato córneo se forma de manera imperfecta y aparecen las grandes escamas blancas adheridas a las placas.<sup>56</sup>

En la dermis, el SI cutáneo conocido bajo las siglas SALT (*skin-associated lymphoid tissue*) forma la **barrera inmunológica** de la piel. Este sistema está constituido por células residentes pertenecientes tanto al SI innato como adaptativo, y entre ellas se incluyen células de Langerhans, DC mieloides (mDCs) y linfocitos, principalmente células T memoria CLA+ (antígeno linfocítico cutáneo). Existe además una circulación constante de

células T efectoras no residentes CLA<sup>+</sup> atraídas por la quimocina CCL27 sintetizada por queratinocitos que completan la vigilancia inmunológica de la piel.<sup>22</sup> Las células inmunitarias mantienen una íntima relación con el resto de células tisulares de la piel como los queratinocitos, los fibroblastos y el endotelio mediante distintas citocinas, quimiocinas e ILs. Estas células, pese a no ser consideradas células inmunitarias ‘profesionales’ son también inmunológicamente activas.



**Figura 4.** Proceso de cornificación. Esquema de la epidermis dividida en sus distintos estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo. En los distintos estratos se especifica el proceso de diferenciación celular que culmina con la cornificación y la descamación del corneocito. Modificada de Denecker G et al, J Cell Biol. 2008.<sup>61</sup>

De hecho, los queratinocitos, provistos de distintos receptores centinela capaces de identificar patrones moleculares altamente conservados asociados a patógenos (PAMPs) o ‘peligro/daño tisular’ (DAMPs) como los receptores *toll-like* (TLRs), participan en la respuestas inmunitarias (tanto innatas como adaptativas) desencadenadas por distintos factores como el traumatismo, la infección o la estimulación por citocinas.<sup>62</sup> En respuesta a ello, los queratinocitos pueden aumentar su proliferación, aumentar la expresión en membrana de moléculas HLA-DR, sintetizar moléculas inmunológicamente efectoras

## INTRODUCCIÓN

como los AMPs y las ILs, y reclutar más células inmunitarias del torrente sanguíneo incluyendo células T, DCs, neutrófilos y macrófagos mediante la producción de potentes quimiocinas.<sup>22</sup> Por otro lado, el endotelio es capaz de activarse en respuesta a una agresión y promover la inflamación mediante la vasodilatación (y formación de endotelio alto venular), la trasudación de moléculas séricas y la extravasación leucocitaria (o diapédesis).<sup>3</sup>

La respuesta inmunológica desencadenada en la piel, incluyendo el perfil de citocinas, quimiocinas e ILs producidos, y el tipo de células inmunitarias efectoras reclutadas y activadas, dependerá de la naturaleza e intensidad de la agresión inicial.<sup>22</sup> Por ejemplo, el trauma inducirá un daño en el queratinocito y su activación la producción de AMPs, ILs y CCL20, una potente quimiocina capaz de reclutar mDCs y células T productoras de IL-17 (T17), estableciendo una respuesta inmunológica/tisular que permitirá la curación de la herida.<sup>63</sup> Por otro lado, la infección viral activará la producción epidérmica de AMPs que formará complejos con los ácidos nucleicos virales y activará las DCs a producir INF tipo I y quimiocinas *C-X-C motif ligand* (CXCL)10 y CXCL11 para reclutar células Th1 y promover una respuesta inmunológica antiviral. La infección bacteriana activará otros mecanismos provocando la secreción de factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , el reclutamiento de neutrófilos y la producción de CCL20 con el consecuente reclutamiento de DCs y células Th17, estableciéndose así una respuesta inmunológica antibacteriana.<sup>64</sup> Finalmente, el queratinocito también es capaz de producir la linfoproteína estromal tímica, considerada como una potente quimiocina promotora de las respuestas Th2.<sup>65</sup>

### **1.8.2. Psoriasis como alteración de la respuesta fisiológica cutánea**

Normalmente, la respuesta inflamatoria en la piel ante una agresión es rápida, eficiente y autolimitada, lo que permite neutralizar los patógenos y curar las heridas de manera eficaz.<sup>66,67</sup> Sin embargo, la alteración de los mecanismos inmunológicos y la imposibilidad de alcanzar la homeostasis cutánea puede favorecer una respuesta inflamatoria descontrolada y, eventualmente, el desarrollo de enfermedades inflamatorias.<sup>68</sup> En Psoriasis, la alteración de la respuesta inmunológica y la sucesión descontrolada de los mecanismos fisiológicos cutáneos contribuyen a una respuesta inflamatoria persistente y a

una reepitelización exagerada que va más allá de la fase de curación y remodelación de una herida cutánea.<sup>3</sup>

Por un lado, la proliferación y activación del endotelio contribuyen al **eritema** observado en las placas psoriasicas. Por otro lado, la reepitelización aumentada fruto de la activación y proliferación del queratinocito condiciona dos aspectos fundamentales en Psoriasis; 1) el engrosamiento de la epidermis (acantosis) que junto con el infiltrado inflamatorio condiciona la **infiltración** de la placa, y 2) alteración en la maduración del queratinocito que en lugar de compactarse en forma de corneocito, reduce su síntesis de queratina y lípidos y mantiene el núcleo (paraqueratosis), provocando la presencia de grandes escamas que se desprenden (**hiperqueratosis** y **descamación**).

### **1.8.3. Mecanismos inmunológicos subyacentes en la Psoriasis**

Los mecanismos por los que se origina y se establece la respuesta inflamatoria anómala en la Psoriasis son complejos y se suceden de manera recurrente y solapada. Cuál es la estirpe celular primariamente implicada (queratinocito vs linfocito) o si bien es el SI innato o adaptativo el responsable la enfermedad sigue siendo un tema de gran controversia. Lo cierto es que la Psoriasis es una enfermedad con respuestas inmunológicas dinámicas que implican la práctica totalidad de las células presentes en la piel. La identificación en los últimos años de un autoantígeno y la descripción de los distintos ejes de citocinas que participan como mediadores de la inflamación y respuesta tisular ha contribuido a establecer un paradigma fisiopatogénico sólido de la enfermedad.

#### **1.8.3.1. Fase de inducción**

Los mecanismos íntimos por los que los distintos factores desencadenantes actúan y originan una respuesta inflamatoria aberrante en Psoriasis son todavía poco conocidos. En individuos genéticamente determinados, las infecciones, los fármacos o el daño tisular conduciría a la presencia de moléculas que actuarían como PAMPs o DAMPs, respectivamente. Estos PAMPs/DAMPs dañan al queratinocito que, mediante el inflamosoma, producirían distintas citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18.<sup>69</sup> Estas citocinas activarían a otros queratinocitos de alrededor a secretar más IL-1 $\beta$ , IL-

## INTRODUCCIÓN

6 y TNF- $\alpha$ , LL37 y quimiocinas como la CCL20, amplificando así la señal inmunológica.<sup>70</sup> Este ambiente de citocinas estimularía otras células dérmicas (endoteliales, fibroblastos y mDCs), que promoverían el reclutamiento de más leucocitos (incluyendo DCs plasmocitoides (pDC) y células T) y activaría una respuesta inmunológica adaptativa.<sup>71</sup>

En una piel sana, dicha inflamación conduciría a la curación de la herida o a la reducción del agente agresor inicial. Sin embargo, en Psoriasis, la producción de citocinas y AMPs está aumentada, y la existencia de moléculas que actúan como autoantígenos conduce a una respuesta inmunológica aberrante. En un primer paso, precursores hematopoyéticos circulantes atraídos a la piel por el gradiente de quimiocinas (CCL20) y el ambiente proinflamatorio local se activarían en forma de pDC.<sup>72,73</sup> Estas células especializadas en la detección de ácidos nucleicos virales mediante sus receptores TLR7 y 9, son capaces de reconocer complejos formados por RNA o DNA propio y LL37, un AMP altamente expresado en las placas psoriasisicas.<sup>74</sup> Otros AMPs como las  $\beta$ -defensinas y la lisozima son capaces también de condensar DNA propio, ser endocitados y reconocidos por TLR9 y así, contribuir a la activación de las pDC.<sup>75</sup> Esta activación representa una primera ruptura a la tolerancia inmunológica frente antígenos propios y ocurre en una estirpe celular clave, las DCs, puente entre la inmunidad innata y la adaptativa.

Las pDCs activadas promoverán la inflamación mediante a) la secreción de grandes cantidades de INF- $\alpha$  y INF- $\beta$  que estimulará y diferenciará las mDCs residentes en mDCs maduras, y b) la presentación de (auto)antígenos mediante sus moléculas MHC-I (p.e. HLA-Cw602) que promoverá la expansión clonal de células T CD8+. Esta expansión clonal supone una nueva ruptura con la tolerancia inmunológica en Psoriasis y ocurre tanto en la piel (estimulación de células T residentes) como en los ganglios locoregionales (estimulación de células T naïve). Las células T activadas migrarán a la epidermis donde al interactuar con los MHC-I de los queratinocitos (o melanocitos) secretarán más citocinas, quimiocinas y mediadores de la inmunidad innata que a su vez estimularán la inflamación y la activación del queratinocito.<sup>53</sup>

La expansión clonal de células T CD8<sup>+</sup> presume la existencia de un autoantígeno en Psoriasis. El antígeno inicial podría ser del propio AMP LL37, presentado por las DCs inicialmente a células T CD8<sup>+</sup> y posteriormente a células T CD4<sup>+</sup>. En este sentido, *Lande et al.* demostraron que hasta 2/3 de los pacientes con PV presentaban células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicas para LL37, capaces de responder con la producción de citocinas patogénicas incluyendo IL-17.<sup>32</sup> Sin embargo, este no es el único autoantígeno propuesto, y distintos autores han presentado distintos trabajos implicando a queratina 17<sup>36</sup>, ADAMTSL5<sup>33</sup> y PLA2G4D.<sup>76</sup> Es posible que el antígeno inicial pueda diferir según los individuos y que con la cronificación de la enfermedad se produzca un fenómeno de expansión (*spreading*) antigénica.

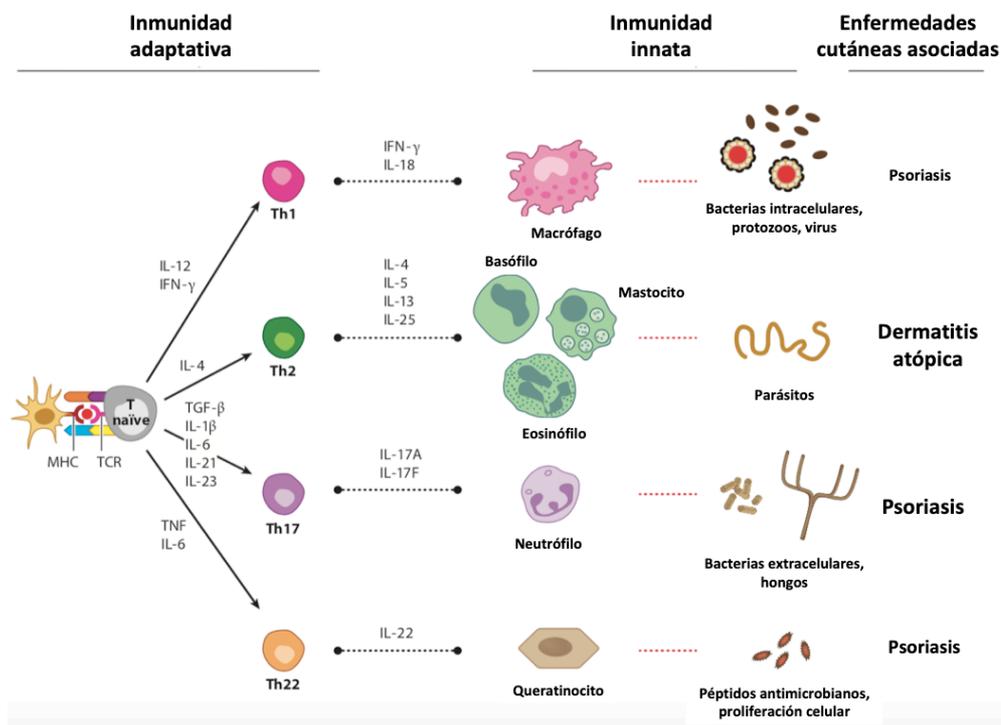
### 1.8.3.2. Fase efectora

Las mDCs residentes son activadas por el INF- $\alpha$  producido por las pDCs. Sin embargo, su activación también puede desencadenarse por el reconocimiento de complejos RNA propio- LL37 por receptores TLR8, rompiendo de nuevo la tolerancia inmunológica.<sup>77</sup> Las mDCs maduras junto a otras mDCs inflamatorias reclutadas en la piel desarrollan un papel clave en Psoriasis al promover una respuesta inmunitaria adaptativa. Ambas células son capaces de establecer sinapsis inmunológicas con las células T CD4<sup>+</sup> y producir importantes ILs (p.e. IL-12 e IL-23) que permitirán la activación y polarización de las células T en sus subtipos efectores. Cada línea celular se caracteriza por la activación de unos determinados factores de transcripción nuclear y la producción de un perfil de citocinas determinado; en psoriasis, el linaje celular más relevantes es Th17, y en menor grado Th22 y Th1 (ver **figura 5**).<sup>3</sup> Pese a las diferencias entre los distintos subtipos celulares, existe cierta redundancia y solapamiento en las citocinas producidas (p.e. TNF- $\alpha$  secretado por distintos linajes celulares), y una plasticidad celular que permite el cambio de linaje bajo determinados microambientes tisulares.<sup>53</sup> Es de destacar que la polarización de las células T orquestada por las mDCs activadas depende tanto del tipo de insulto inicial (ya sea un agente infeccioso o un antígeno propio) como del contexto inflamatorio en el que se establece la respuesta inmunológica.<sup>78</sup>

Además de las citocinas producidas por las DCs, parte de este contexto inflamatorio está creado por células T $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, una de las fuentes más importantes y precoces de IL-17A en

## INTRODUCCIÓN

piel.<sup>79</sup> Estas células comparten muchas características con las Th17 como el receptor huérfano del retinoide (ROR $\gamma$ ), el receptor aryl hidrocarbonado (AhR) y el receptor de IL-23, y son una fuente innata de IL-17 e IL-22. A diferencia de las células Th17 (y otras células T $\gamma\delta^+$ ), las células T $\gamma\delta^+$  productoras de IL-17 expresan TLR1 y TLR2 y el receptor Dectin-1 por lo que son capaces de reaccionar directamente frente a determinados patógenos mediante el reconocimiento de PAMPs y otros estímulos endógenos o DAMPS.<sup>80</sup>



**Figura 5.** Diferenciación de las células T en los subtipos celulares más relevantes en piel. Las células dendríticas presentan el antígeno, las señales co-estimuladoras y las citocinas promotoras necesarias para la diferenciación de las células T en sus respectivos subtipos efectoras. Cada subtipo celular producirá nuevas citocinas efectoras que activarán una respuesta inmunitaria específica contra los distintos patógenos. Por ejemplo, las células Th17 requieren para su diferenciación una combinación de transforming growth factor (TGF)- $\beta$  y citocinas pro-inflamatorias (IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-21 y IL-23). Estas células producirán IL-17A, IL-17F y IL-22, imprescindibles para activar al neutrófilo en la respuesta inmunitaria frente a las bacterias extracelulares y hongos, así como para activar al queratinocito para producir péptidos antimicrobianos (AMP). Adaptada de Perera GK et al, *Annual review of pathology* 2012.<sup>3</sup>

Bajo la influencia de IL-23 producida por las mDCs, e incluso antes de la aparición de las células Th17, las células T $\gamma\delta^+$  son capaces de producir grandes cantidades de IL-17A y potenciar una respuesta inmunitaria adaptativa que estructuraría el eje inmunopatogénico IL-23/Th17, el de mayor relevancia en Psoriasis. Así, una respuesta inmunitaria innata inicial en la que estarían implicados queratinocitos, DCs y células T $\gamma\delta^+$  desencadenaría

una potente respuesta adaptativa y una intensa polarización de células T CD4+ a Th17.<sup>81</sup>

Las células T CD4+ activadas infiltrarán la piel y producirán principalmente INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-22, responsables de los cambios histopatológicos psoriasiformes. Por un lado, el INF- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$  y la IL-17 tendrán un importante efecto en la promoción de la inflamación. En concreto, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  activan distintas estirpes celulares, estimulan la función de presentadora de antígenos de las mDCs, inducen la producción de citocinas (INF- $\gamma$  e IL-23) y quimiocinas (CCL20), activan al endotelio y la expresión de moléculas de adhesión para el reclutamiento de células inflamatorias, y potencian tanto el efecto de IL-17 como de IL-22.<sup>3</sup> Por su parte, IL-17 activa el queratinocito amplificando la señal inflamatoria con la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  e IL-6), AMPs, factores estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), la expresión de MHC-II y la producción de quimiocinas incluyendo CCL20 que recluta DCs y células T17, y CXCL8/IL-8 y CXCL1/MGSA, dos potentes quimiocinas para el reclutamiento y activación de neutrófilos.<sup>82</sup> Finalmente, la IL-22 implicada en la homeostasis de los epitelios, en la reparación tisular y en la inflamación, tendrá un efecto directo sobre las células tisulares. En el queratinocito, IL-22 ejerce un potente efecto mitogénico que le induce a proliferar, alterar su maduración (acantosis y paraqueratosis), y promover la síntesis de grandes cantidades de AMPs y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), mediador de la hiperplasia endotelial propia de la enfermedad (ver **figura 6**).<sup>82</sup>

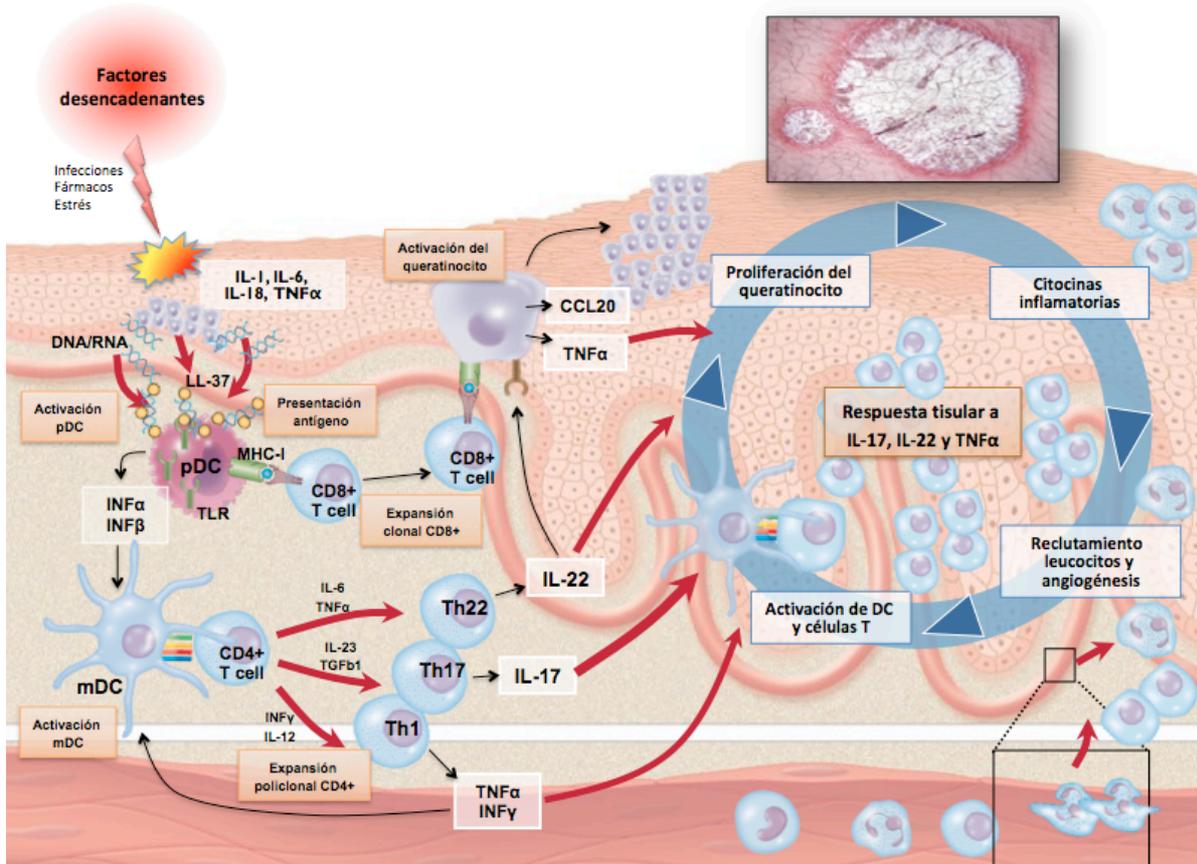
### *1.8.3.3. Perpetuación de la inflamación*

Los mecanismos reparativos activados en Psoriasis por los distintos factores desencadenantes (p.e. infección, fármacos, trauma) o la propia estimulación inmunológica (p.e. Imiquimod, INF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-23), se desarrollan y se establecen de manera aberrante y perpetua. La falta de una regulación negativa, el establecimiento de circuitos de retroalimentación, las señales de amplificación y el desarrollo de una respuesta inmunológica robusta explican este fenómeno.

Inicialmente, la respuesta inmunitaria adaptativa tiene un marcado carácter Th1. Sin embargo, a medida que la enfermedad se cronifica, se impone una respuesta Th17. El perfil de citocinas Th17 (muy en particular IL-17A) ejerce un papel crucial en el mantenimiento

## INTRODUCCIÓN

de la inflamación.<sup>53</sup> Por un lado, esta citocina promueve la inflamación local y mantiene al queratinocito activado, induciendo la secreción de VEGF, quimiocinas (p.e. CCL20) y citocinas que contribuyen al reclutamiento de más células inflamatorias. Por otro lado, la propia IL-17A promueve la diferenciación Th17, potenciando aún más la producción de IL-17A e IL-17F y retroalimentando así el circuito inflamatorio.



**Figura 6.** Paradigma fisiopatológico de la psoriasis. Agresiones externas como el trauma, las infecciones o los fármacos, producen un daño en el queratinocito y la liberación de ácidos nucleicos. En pacientes genéticamente predispuestos, estos ácidos nucleicos propios que forman inmunocomplejos con los AMPs secretados por los queratinocitos (como LL37) son capaces de estimular a las células dendríticas plasmacitoides (pDC) mediante los toll-like receptors (TLR) 7 y 9. Ello activa a las pDCs a presentar un antígeno que promueve la expansión clonal de células CD8+ que migran a la epidermis y activan al queratinocito (o melanocitos) mediante los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH) tipo I. El queratinocito activado produce citoquinas, quimiocinas y mediadores de la inmunidad innata amplificando la señal inflamatoria. El interferón-α (INF-α) e INF-β producidos por las pDCs estimulan a las mDCs a secretar más mediadores pro-inflamatorios como interleuquina-12 (IL-12) e IL-23 y TNF-α. Estas citoquinas promotoras estimulan la diferenciación y actividad de las células T efectoras como Th1, Th17 y Th22 que secretan las principales citoquinas y quimiocina efectoras en psoriasis; IL-17 actúa sobre el queratinocito estimulando a producir péptidos antimicrobianos (AMPs), TNF-α y CCL20 (una potente quimiocina para células T y CDs), y a su vez, recluta polimorfonucleares. IL-22 contribuye a las características histopatológicas propias de la psoriasis, incluyendo la hiperplasia epidérmica, la acantosis y la paraqueratosis. TNF-α, quimiocina pleiotrópica potenciando la actividad inflamatoria en distintos linajes celulares incluyendo a CDs, células T, queratinocitos. En el endotelio, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) estimula la proliferación y formación de capilares tortuosos, así como al reclutamiento de más células inflamatorias.

La participación de un amplio abanico de células inmunitarias en la inflamación subyacente a la Psoriasis potencia la respuesta inmunitaria y su cronicidad. En este sentido, es de destacar que son múltiples los linajes celulares implicados en Psoriasis, incluyendo tanto células inmunitarias (DCs, T CD8+, T CD4+, T $\gamma\delta$ +) como células no-inmunitarias como los queratinocitos, capaces de responder al estímulo inflamatorio, amplificarlo y perpetuarlo mediante la producción de AMPs, citocinas y quimiocinas. La formación de un tejido linfóide terciario por mDCs y células T simulando el tejido ganglionar es otro elemento que contribuye a la perpetuación de la respuesta.<sup>22</sup>

Finalmente, la existencia de un autoantígeno (ya sea LL37, queratina 17, ADAMTSL5 y/o PDAGL2A) favorece una respuesta inmunitaria robusta y longeva. En un primer paso, la inflamación aguda provocaría el reclutamiento y activación de distintos estirpes celulares incluidas las DCs y las células T CD8+. Ambas células romperían la tolerancia inmunológica; la primera mediante el reconocimiento de complejos formados con DNA o RNA propio y LL37 vía TLRs, y la segunda mediante el reconocimiento de antígenos propios presentados por moléculas MHC-I (p.e. HLA-Cw602) de los queratinocitos. La activación de las DCs y la expansión clonal de células T CD8+ favorecerán el desarrollo de una respuesta Th17 que amplificará y perpetuará la inflamación dando lugar a las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En un segundo paso, la cronificación de la inflamación y la tormenta de citocinas facilitará tanto la expansión antigénica como la activación policlonal de células T CD4+, promoviendo la aparición de más células T efectoras, células T memoria residentes y una longeva respuesta inflamatoria.<sup>36</sup> Como resultado, se establece una respuesta inmunitaria con una expansión oligoclonal de células CD8+, así como de otra población celular mayoritariamente CD4+ más amplia, heterogénea y policlonal, propia de los fenómenos autoinmunitarios.<sup>83</sup> Un tratamiento eficaz para la Psoriasis, es capaz de reducir la inflamación cutánea, eliminar la respuesta inmunitaria policlonal y restaurar la homeostasis en la piel. No obstante, la expansión oligoclonal más robusta desencadenada por la sensibilización a un autoantígeno es capaz de generar células T memoria residentes en la epidermis y sobrevivir al tratamiento para, una vez suspendido, reaparecer y activar de nuevo la inflamación y la enfermedad.<sup>84-86</sup>

## INTRODUCCIÓN

En definitiva, si bien la Psoriasis es considerada una enfermedad mediada por células T, tanto el SI innato como el adaptativo están implicados ya en las primeras etapas patogénicas en un proceso dinámico bidireccional en el que ambos se potencian para mantener un proceso inflamatorio persistente. Por este motivo, en esta Tesis Doctoral se han seleccionado receptores del SI innato y adaptativo en aras de abordar de una manera global el estudio de la inmunopatogenia de la enfermedad.

### **1.9. Tratamiento**

Existen distintas modalidades terapéuticas que el dermatólogo debe tener en cuenta a la hora de tratar la Psoriasis, incluyendo el tratamiento tópico, la fototerapia, el tratamiento sistémico convencional y la terapia biológica. Pese al gran avance que ha supuesto la terapia biológica, ningún tratamiento ha demostrado curar la enfermedad, por lo que explicar y asesorar al paciente sobre la naturaleza de la enfermedad y la cronicidad del tratamiento es importante. Por ello, es esencial establecer una estrategia terapéutica no solo de un brote puntual sino para el control a largo plazo de la enfermedad. Ante el amplio arsenal terapéutico, el tratamiento indicado será individualizado y deberá tenerse en cuenta el tipo de Psoriasis, su extensión, el impacto en la calidad de vida, las comorbilidades y enfermedades asociadas, el beneficio potencial y efectos secundarios del fármaco, y en las expectativas y conveniencias del paciente.

Del mismo modo que se trata la afectación cutánea, el dermatólogo debe velar por la salud íntegra del paciente y ser capaz de identificar y abordar la posible afectación articular, las enfermedades asociadas y las comorbilidades. El dermatólogo privilegiadamente posicionado para identificar dichos procesos podrá coordinar la atención multidisciplinar del paciente ayudándose del resto de especialistas implicados (Atención Primaria, Reumatología, Gastroenterología, Cardiología, Endocrinología, Psicología etc.).

A continuación, se revisa el tratamiento de la Psoriasis con fototerapia y agentes biológicos dada su implicación en el trabajo de Tesis Doctoral aquí presentado, y se remite al lector a las respectivas referencias para ahondar en el tratamiento tópico<sup>87</sup> y sistémico de la enfermedad.<sup>88,89</sup>

### 1.9.1. Fototerapia

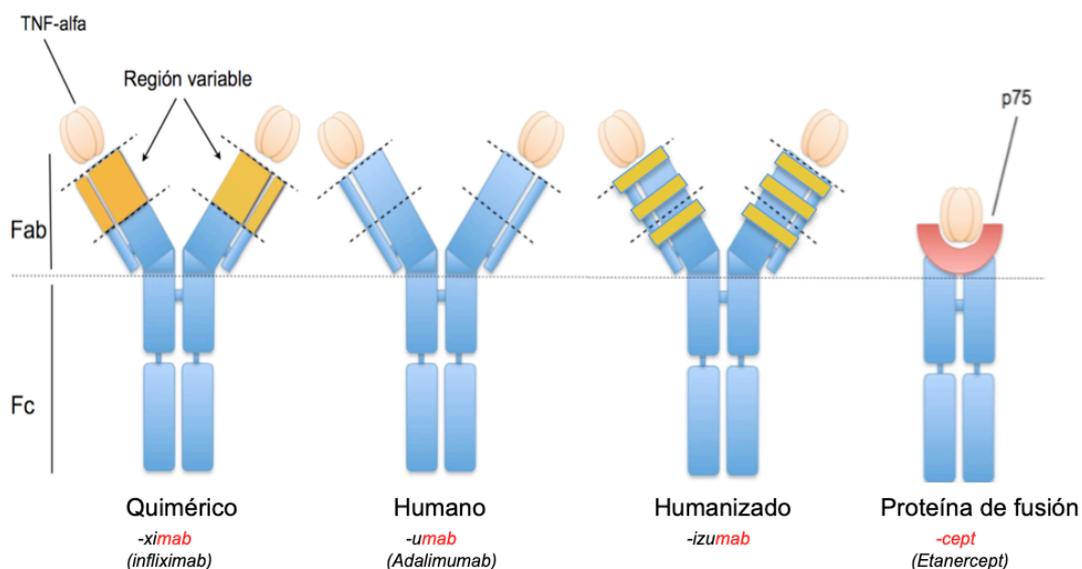
La fototerapia, es un tratamiento clásico muy útil en Psoriasis. Básicamente existen 2 modalidades: UVB de banda estrecha (*narrow band*, UVBnb) y UVA en combinación con la administración tópica u oral de psoralenos como fotosensibilizantes (PUVA). La irradiación con ultravioleta de la piel psoriasica disminuye la inflamación fundamentalmente gracias a su efecto dual inmunosupresor y apoptótico sobre los queratinocitos y células T.<sup>90</sup> Ello permite disminuir la tasa de proliferación epidérmica y el infiltrado inflamatorio de la enfermedad. Además, la fototerapia modifica el perfil inmunológico Th17 propio de la Psoriasis restaura la función de las células Treg.<sup>90</sup> Esta modalidad de tratamiento puede ser muy eficaz, incluso en casos graves, con un porcentaje de eficacia global en torno al 70-80%.<sup>91</sup> La mayoría de dermatólogos eligen la modalidad UVBnb dado su perfil de seguridad y comodidad ya que no requiere tomar psoralenos; sin embargo, el PUVA suele ser más eficaz, consiguiendo blanquear al paciente en menos sesiones y por más tiempo.<sup>92</sup> El principal inconveniente de este tratamiento es la necesidad de acudir varias veces por semana a una unidad de fototerapia especializada, así como el riesgo de desarrollo de cáncer de piel no melanoma en pacientes que han recibido múltiples sesiones, principalmente de PUVA.<sup>93</sup>

### 1.9.2. Fármacos biológicos

La terapia biológica ha revolucionado el tratamiento de la Psoriasis moderada-grave. Desde su introducción a principios de este siglo, estos fármacos han superado muchas de las limitaciones, en términos de eficacia y seguridad, de los tratamientos sistémicos ‘clásicos’. Están indicados en pacientes con Psoriasis moderada-grave (PASI y/o BSA y/o DLQI>10) refractarios al tratamiento con Metotrexate, Ciclosporna, Acitretino o fototerapia, o que presentan contraindicación o intolerancia al mismo.<sup>89</sup> Su estructura molecular en forma de inmunoglobulina o proteína de fusión diseñada (ver **figura 7**) para bloquear moléculas relevantes en la patogenia de la Psoriasis, aporta a estos fármacos una gran especificidad y excelente perfil riesgo/beneficio. Actualmente existen múltiples fármacos biológicos según su diana terapéutica aprobados en España: 3 fármacos anti-TNF- $\alpha$  (Infliximab, Etanercept y Adalimumab), un fármaco anti-IL-12/IL-23 (Ustekinumab), 2 fármacos anti-IL23 (Guselkumab, Tildrakizumab), 2 fármacos anti-IL-17 (Secukinumab, Ixekizumab) y un fármaco anti-recepto A de la IL-17 (Brodalumab). Sin

## INTRODUCCIÓN

embargo, la revolución farmacológica iniciada en la llamada ‘era biológica’ es imparable y próximamente se aprobarán nuevos fármacos para su uso en Psoriasis. Debido a que la terapia anti-TNF- $\alpha$  fue la primera en aprobarse en Psoriasis y la estudiada en el 4º proyecto de investigación de esta Tesis Doctoral, se exponen a continuación los tres fármacos biológicos anti-TNF- $\alpha$ .



**Figura 7.** Representación esquemática de los principales fármacos biológicos utilizados en Psoriasis según su estructura molecular; -mab = anticuerpo monoclonal (quimérico(-xi), humano (-u), humanizado (-izu)). -cept = proteína de fusión. En amarillo, fracciones murinas; en rojo, receptor p75 del TNF- $\alpha$ . Fab = fracción de unión al antígeno; Fc = fracción constante.

### 1.9.2.1. Terapia anti-TNF- $\alpha$

Los fármacos anti-TNF- $\alpha$  fueron los primeros biológicos en aparecer en el escenario.<sup>94</sup> Los dermatólogos adoptaron estos tratamientos de la mano de los reumatólogos que ya en ese momento acumulaban una amplia experiencia en artritis inflamatoria.<sup>95</sup> Actualmente, existen 3 fármacos anti-TNF- $\alpha$  indicados en psoriasis: Infliximab, Etanercept y Adalimumab.<sup>94,96,97</sup> Estos fármacos también están indicados en el tratamiento de la Artritis Reumatoide (AR), APs, Artritis Juvenil Crónica, EC, Colitis Ulcerosa, Espondilitis Anquilosante (EA) e Hidrosadenitis Supurativa. A continuación se describen cada uno de los fármacos.

El TNF- $\alpha$  es una citocina pro-inflamatoria producida por una gran variedad de células incluyendo células inmunitarias y los queratinocitos. Juega un papel central en la patogénesis de la Psoriasis y otras enfermedades inflamatorias. El TNF- $\alpha$  se libera de las células en su forma soluble (sTNF- $\alpha$ ) mediante la escisión de su forma precursora unida a membrana (tmTNF- $\alpha$ ). Ambas formas son biológicamente activas y se unen a sus dos receptores TNFR1 (p55) y TNFR2 (p75), activando la vía de transcripción NF-kB (inflamación) y la apoptosis.

Desde el punto de vista estructural, los fármacos anti-TNF- $\alpha$  pueden clasificarse en a) anticuerpos monoclonales (AcMos) (Infliximab y Adalimumab) y b) proteínas de fusión (Etanercept) (ver **figura 7**). Todos ellos presentan una región variable capaz de unirse al TNF- $\alpha$  soluble y una región Fc de IgG (Fc $\gamma$ ). Su unión al TNF- $\alpha$  bloquea las acciones inmunológicas dependientes de esta citocina pro-inflamatoria tan relevante en las enfermedades inflamatorias. Además, son capaces de unirse al TNF- $\alpha$  situado en la membrana de diferentes células inmunitarias patogénicas, favoreciendo su apoptosis por citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC) vía receptores Fc-gamma (Fc $\gamma$ Rs).<sup>98</sup> Entre ellos, existen diferencias farmacocinéticas, en la inmunogenicidad y efecto farmacodinámico dependientes de su estructura molecular que junto con la compleja biología del TNF- $\alpha$  explican las diferencias en eficacia y efectos adversos observado en el uso de estos fármacos.<sup>99</sup>

Infliximab es un AcMo quimérico tipo IgG1 humano con una región variable murina altamente efectivo en el tratamiento de Psoriasis. Se administra de modo intravenoso a dosis de 5mg/kg a las semanas 0, 2 y 6, y posteriormente cada 8 semanas, obteniéndose una rápida respuesta en la mayoría de pacientes (PASI75 = 80%) en tan solo 10 semanas de tratamiento.<sup>100</sup> Infliximab es un fármaco muy inmunogénico debido a su estructura quimérica lo que favorece la aparición de anticuerpos anti-fármaco (*anti-drug antibodies* o ADAs), la pérdida de eficacia del tratamiento y la aparición de reacciones de infusión (especialmente los pacientes sin tratamiento inmunosupresor concomitante o administración discontinua del fármaco).<sup>101</sup>

## INTRODUCCIÓN

Adalimumab es un AcMo IgG1 anti-TNF- $\alpha$  totalmente humano. Su vía de administración es subcutánea y tras una dosis de carga de 80 mg, se administra quincenalmente a dosis de 40 mg. La eficacia en términos PASI75 es del 70% en la semana 16 de tratamiento.<sup>100</sup> La aparición de ADAs es menos frecuente que con Infliximab, aunque también se asocia a pérdida de eficacia, comprometiendo la supervivencia del fármaco.<sup>101</sup>

Etanercept es un proteína de fusión humana consistente en la porción Fc de IgG1 humana unida al receptor del TNF- $\alpha$  humano (p75). Se administra subcutáneamente a dosis de 25-50 mg 1 o 2 veces por semana. Es un fármaco de acción más lenta que los anteriores obteniéndose una respuesta PASI75 del 50% en la semana 12, y del 60% en la 24 con su dosificación más alta (50 mg, 2 veces por semana).<sup>100</sup> La inmunogenicidad de etanercept es muy baja detectándose ADAs en tan solo el 1,2% de pacientes.<sup>101</sup>

Entre los efectos adversos inherentes de los agentes anti-TNF- $\alpha$ , se incluye un riesgo aumentado de infecciones de piel y tejidos blandos, herpes zoster y de reactivación de tuberculosis latente (especialmente por Infliximab y Adalimumab). Con mucha menos frecuencia estos agentes pueden inducir o exacerbar una insuficiencia cardíaca, Esclerosis Múltiple o Lupus Eritematoso Sistémico (LES).<sup>100</sup>

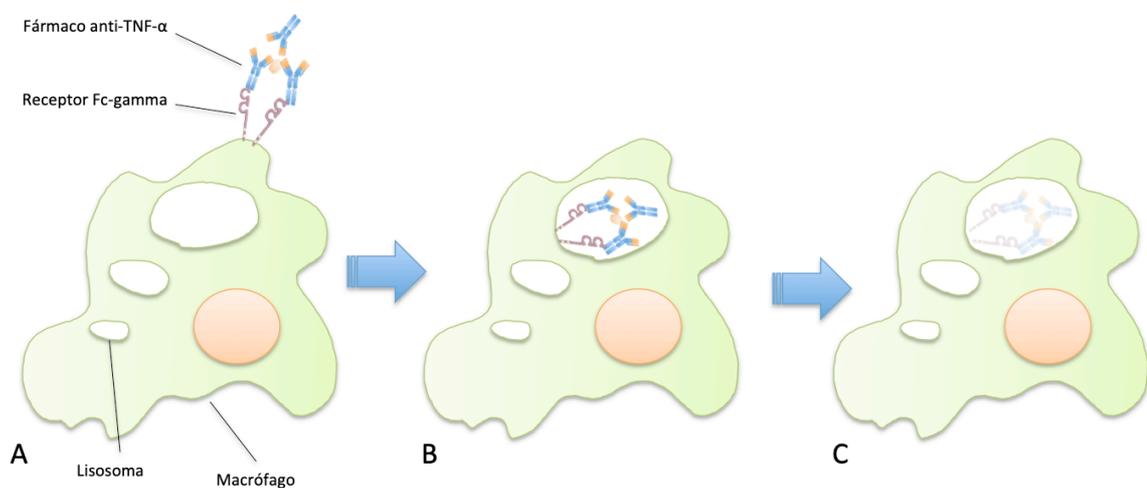
### ***1.9.2.2. Farmacocinética de los fármacos biológicos***

A diferencia de los fármacos convencionales, metabolizados y excretados vía renal o biliar, los fármacos biológicos son eliminados del organismo fundamentalmente a través de la receptación celular y degradación proteolítica.<sup>102</sup> El aclaramiento de estos fármacos muestra dos patrones distintos: a) un patrón lineal dependiente de Fc $\gamma$ R y FcRn, y b) otro patrón no-lineal mediado por la interacción específica del fármaco con su diana terapéutica, en el que también están implicados los Fc $\gamma$ Rs.<sup>102</sup>

Los fármacos biológicos se unen a Fc $\gamma$ R y FcRn mediante su fragmento Fc y representan el principal mecanismo encargado de su eliminación.<sup>103</sup> El FcRn es un receptor endosómico ubicado principalmente en las células del sistema retículo-endotelial (SRE) y constituye un

importante sistema de regulación de la homeostasis de la IgG. En condiciones fisiológicas, la IgG es captada por las células del SRE por pinocitosis formando parte de los endosomas. En el endosoma, la IgG que se une a FcRn es redirigida a la superficie celular y liberada de nuevo al medio exterior. La IgG que no es capaz de unirse a FcRn sí acaba siendo degradada en el lisosoma. La mayor afinidad de IgG1, IgG2 e IgG4 por FcRn explica su mayor semivida (21 días) respecto a la de IgG3 (7 días). Los fármacos biológicos por su similitud estructural con la IgG utilizan este mismo mecanismo para evitar su rápida degradación aumentando así su vida media.<sup>102</sup>

Los Fc $\gamma$ R están presentes en la gran variedad de células inmunitarias y del SRE. Estos receptores participan en el catabolismo de la IgG, permitiendo la internalización de los inmunocomplejos (ICs) formados por IgG, para ser posteriormente degradados en los lisosomas.<sup>104</sup> Del mismo modo, ICs formados por fármaco biológico y su antígeno podrían interactuar con los Fc $\gamma$ R presentes en el SRE y ser posteriormente degradados siguiendo esta ruta catabólica (ver **figura 8**).<sup>103,104</sup>



**Figura 8:** Mecanismo propuesto de eliminación de agentes anti-TNF- $\alpha$  mediado por Fc $\gamma$ R. a) Los receptores Fc $\gamma$ R activadores situados en la superficie de las células del sistema retículoendotelial se unen a los IC formados por el fármaco anti-TNF- $\alpha$  y el fármaco. b) Los Fc $\gamma$ R activados inducen la fagocitosis del IC que pasará a los lisosomas. c) El fármaco anti-TNF- $\alpha$  es proteolizado en el interior del lisosoma.

## INTRODUCCIÓN

### *1.9.2.3. Aspectos farmacoeconómicos*

El coste de los fármacos biológicos es muy elevado en comparación con los tratamientos clásicos y representa el principal obstáculo para su uso en práctica clínica. Pese a su gran eficacia, la existencia de fracasos terapéuticos hace que la relación coste/eficacia pueda ser en muchos casos poco favorable.

Existen distintos estudios y meta-análisis que analizan la relación coste/eficacia del tratamiento biológico en la Psoriasis. *Puig et al.* analizaron datos recogidos de un meta-análisis que incluía todos los ensayos clínicos realizados en Psoriasis con terapia biológica y concluyeron que, Adalimumab presentaba la mejor relación coste/eficacia para el paciente tratado con éxito (16.136 euros/año), seguido de Infliximab (16.820 euros/año) y Etanercept (20.178 euros/año).<sup>105</sup> Estos costes son muy superiores al coste del fármaco según ficha técnica debido a los fallos terapéuticos que existen y encarecen el coste total por paciente tratado con éxito.

En un escenario ideal y en aras de mejorar la relación coste/eficacia, sería deseable tratar con fármacos biológicos aquellos pacientes que tuvieran una alta probabilidad de presentar una respuesta clínica satisfactoria. Lamentablemente, hoy en día no disponemos de ningún marcador predictivo que permita conocer qué paciente será buen o mal respondedor al tratamiento anti-TNF- $\alpha$ . El estudio farmacogenético de estos fármacos podría aportar marcadores predictivos de respuesta y así establecer qué pacientes pueden beneficiarse de ella. Estos marcadores farmacogenéticos tendrían un impacto no sólo en la eficacia terapéutica y calidad asistencial en el paciente, sino que también serían un instrumento de gran utilidad en farmacoeconomía.

## 2. Receptores *toll*-like y patología inmunomediada

### 2.1. Introducción

En las últimas 3 décadas se han realizado grandes investigaciones encaminadas a conocer cómo el organismo es capaz de desencadenar una respuesta inflamatoria frente a patógenos exógenos. En 1992, Chales Janeway sugirió la existencia de receptores genéticamente codificados denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR), capaces de reconocer estructuras moleculares altamente conservadas en la evolución presentes en los microorganismos patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs). Este nuevo paradigma, revolucionó la comprensión de cómo el organismo se enfrenta y responde de manera innata ante la agresión microbiana.<sup>106</sup> Por primera vez, se planteó el hecho que la respuesta inmunitaria inicial ante una agresión microbiana no era realmente ‘inespecífica’ sino que era desencadenada tras el reconocimiento de patrones moleculares propios de los patógenos mediante una serie de receptores codificados en el genoma humano comunes a todos los individuos.

Posteriormente, el concepto ‘PAMP’ se extendió a moléculas endógenas intracelulares liberadas al medio exterior producto del daño tisular (como los ácidos nucleicos propios o componentes de la matriz extracelular dañados), llamadas patrones moleculares asociados a peligro/daño tisular (*damage-associated molecular patterns*; DAMPs). Así, estos mismos PRRs eran capaces de reconocer moléculas endógenas y desencadenar también una respuesta inmunitaria.<sup>107</sup> Con ello, el estudio de estos receptores no se limitó al campo de la infección sino que se amplió también al campo de la homeostasis de los tejidos y de la enfermedad autoinmunitaria.<sup>107</sup>

Los PRRs se expresan tanto en las células inmunitarias (preferentemente macrófagos y DCs), como no inmunitarias (epitelios que ejercen de interfase entre el medio interno y externo como el respiratorio o la epidermis).<sup>108</sup> De este modo, estos receptores actúan como centinelas en los sitio de mayor interacción huésped-patógeno y representan uno más de los sistemas de respuesta inmunitaria innata del organismo.<sup>109</sup>

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, se conocen 4 grandes familias de PRR en las que se incluyen proteínas transmembrana como los *Toll-like receptors* (TLRs) y los *C-type lectin receptors* (CLRs), y proteínas citoplasmáticas como los *retinoic acid-inducible gene(RIG)-1-like receptors* (RLRs) y los *NOD-like receptors* (NLRs).<sup>110</sup> De todos ellos, los TLRs han sido los primeros y los más ampliamente estudiados tanto desde un punto de vista fisiológico como patológico.<sup>111</sup> En los últimos años, se han descrito las distintas funciones fisiológicas desarrolladas por los TLRs, sus ligandos PAMPs y su contribución en la defensa del organismo ante la invasión microbiana y la agresión. Sin embargo, estos receptores también han sido relacionados con la sepsis, y es que la respuesta exagerada del sistema TLR frente a sus ligandos puede conducir a una inflamación dañina para el organismo y eventualmente al shock séptico.<sup>110</sup> Además, estos receptores como mediadores de la inflamación capaces de reconocer moléculas endógenas como DAMPs han suscitado un gran interés en la comunidad científica describiéndose múltiples ligandos propios y asociándolos a centenares de procesos inflamatorios de distinta índole como Aterosclerosis, Lupus eritematoso sistémico (LES) o Psoriasis entre otros.<sup>112,113</sup>

### 2.2. TLRs: estructura molecular y sus ligandos

Actualmente, se han descrito 10 TLRs (TLR1-10) en humanos. Estos receptores son proteínas transmembrana tipo I constituidas por a) un ectodominio rico en repeticiones de leucina (LRRs) responsable del reconocimiento de los PAMPs y DAMPs; b) un dominio transmembrana; c) un dominio intracelular *Toll* homólogo al del receptor de IL-1 (TIR), responsable de transducir señales intracelulares. Cada TLR (organizados en homo- o heterodímeros) reconoce distintos PAMPs de una gran variedad de microorganismos, incluyendo lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos bacterianos, fúngicos, víricos o de parásitos (**tabla 1**). Sin embargo, también son capaces de reconocer componentes propios como ácidos nucleicos propios (tanto DNA como RNA), *heat shock proteins* (HSP), *high-mobility group box1* (HMBG1) y componentes de la matriz extracelular (ECM).<sup>111</sup>

Para la activación del receptor, es necesario la formación de homo- o heterodímeros y la unión de su ligando. Por ejemplo, TLR2 forma heterodímeros con TLR1 o TLR6 siendo los ligandos (PAMPs y DAMPs) reconocidos por cada heterodímero cualitativamente

distintos: TLR2/TLR1 reconocen lipoproteínas triacil mientras TLR2/TLR6 lipoproteínas diacil. El resto de TLRs forman homodímeros para su activación.<sup>111</sup>

**Tabla 1.** TLRs y sus ligandos asociados.

TLR	Localización	PAMP	Origen	DAMP
TLR1*	Membrana plasmática	Lipoproteína triacil (TLR2)	Bacteria	
TLR2	Membrana plasmática	Lipoproteína triacil (TLR1) Lipoproteína diacil (TLR6)	Bacteria, virus, parásitos	HMBG1, Hsp, ECM
TLR3	Endolisosoma	dsRNA	Virus	
TLR4	Membrana plasmática	LPS	Bacteria, virus	HMBG1, Hsp, ECM, Ox-LDL, β-amiloide, Ox-fofolípido, β-denfensina2
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina	Bacteria	
TLR6**	Membrana plasmática	Lipoproteína diacil (TLR2)	Bacteria, virus	Ox-LDL, β-amiloide
TLR7	Endolisosoma	ssRNA	Virus, bacterias	RNA propio
TLR8	Endolisosoma	ssRNA	Virus, bacterias	RNA propio
TLR9	Endolisosoma	CpG-DNA	Virus, bacteria, protozoos	DNA propio
TLR10	Endolisosomas	Desconocido	Desconocido	

\* Forma heterodímeros con TLR2; \*\* Forma heterodímeros con TLR2. Abreviaturas: TLR = receptores *toll-like*; PAMP = *pathogen-associated molecular pattern*; DAMP = *damage-associated molecular pattern*; LPS = lipopolisacárido; RNA = ácido ribonucleico; DNA = ácido desoxiribonucleico; ss = *single strain*; ds = *double strain*; HMBG1 = *high-mobility group box 1*; HSP = *Heat Shock Protein*; ECM = matriz extracelular; Ox = oxidado; LDL = lipoproteína de baja densidad.

### 2.3. Localización de TLRs, tráfico intracelular e implicaciones funcionales

Los distintos TLRs se localizan en distintos compartimentos celulares, incluyendo la membrana plasmática (TLR1, 2, 3, 4, 5 y 6) y la membrana de endosomas, fagosomas y

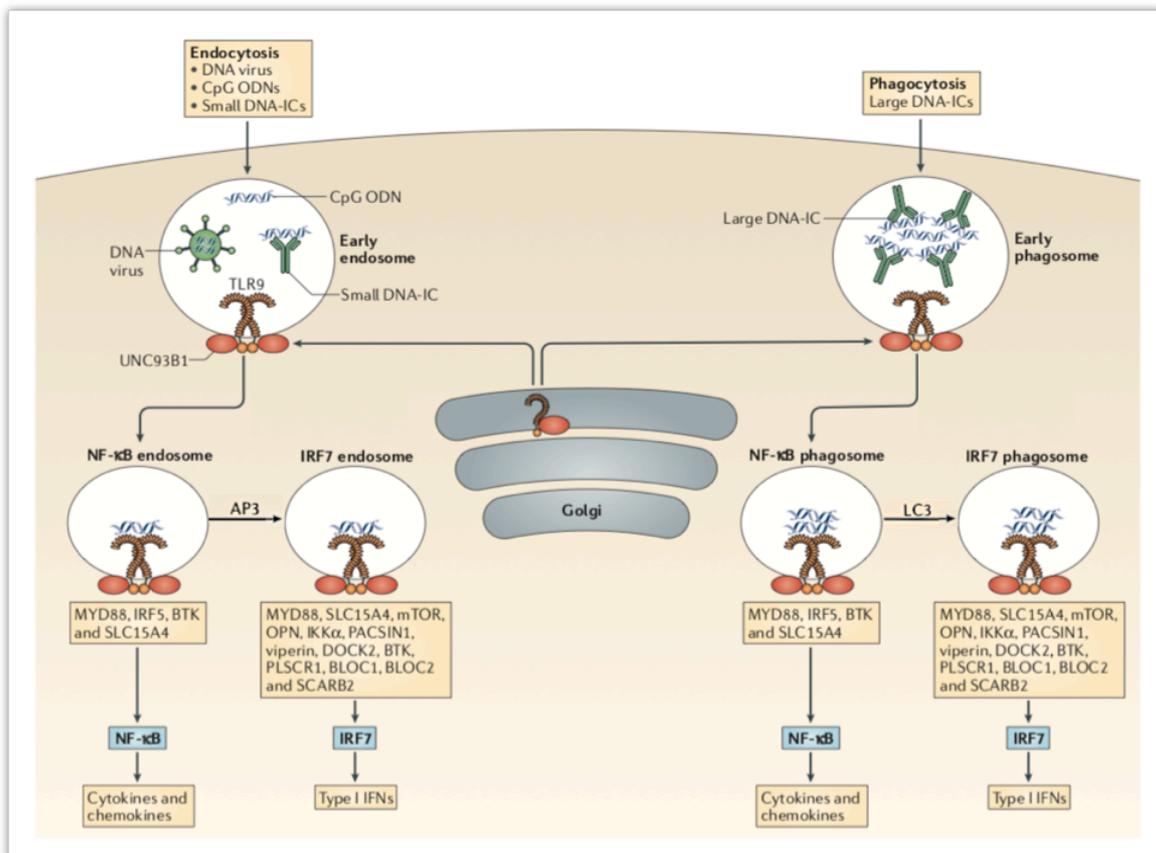
## INTRODUCCIÓN

lisosomas (TLR3, 7, 8 y 9). La localización subcelular del receptor, el TLR específico y la célula continente de éste determinarán su accesibilidad al ligando y la respuesta inflamatoria derivada de su activación.<sup>114</sup> De este modo, los TLRs de superficie celular reconocerán principalmente PAMPs de las membranas microbianas como la flagelina, lípidos y lipoproteínas de la pared bacteriana, mientras que los TLRs intracelulares presentes en los endosomas y lisosomas reconocerán ácidos nucleicos microbianos. Por lo tanto, existe una coherencia entre la ubicuidad de los antígenos con la localización y especificidad de los distintos TLRs.

En relación al transporte de los TLRs intracelulares, es de destacar el complejo funcionamiento que regula su actividad. TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se sintetizan en el retículo endoplasmático (RE) y son conducidos a endolisosomas o fagolisosomas por la proteína endoplasmática UNC93B1.<sup>115</sup> Sin embargo, existen otras proteínas que dirigen el tráfico de los endosomas y fagosomas que contienen TLRs intracelulares y que influirán en su actividad. Los mecanismos de señalización y tráfico intracelular mejor descritos son para TLR7 y TLR9, en los que se ha implicado a Arl8b, Rab7a<sup>116</sup> y AP3 y LC3, respectivamente.<sup>117</sup> En dichos compartimentos subcelulares los TLRs intracelulares serán finalmente ensamblados y procesados para su correcto funcionamiento. En concreto, el ambiente ácido del lisosoma permite la escisión parcial del receptor, su dimerización y la transmisión de señales al reconocer los ácidos nucleicos fagocitados por la célula.<sup>116</sup> Este mecanismo representa un importante mecanismo regulador de la actividad del receptor y evita una posible activación perjudicial para la célula.

Según el tamaño de los complejos moleculares fagocitados, se formarán pequeñas vesículas endosómicas o grandes fagosomas.<sup>117</sup> Los pequeños fragmentos libres y los ICs de ácidos nucleicos son incorporados al endosoma por endocitosis o vía FcγRIIa, respectivamente. Los grandes complejos moleculares fagocitados por DCs o macrófagos son englobados por fagosomas. En las pDCs, una vez los TLR7 y TLR9 son activados por los ácidos nucleicos, el propio tráfico del lisosoma dirigirá la actividad de estos receptores; en un primer momento, cuando el lisosoma se encuentra en la región perinuclear, TLR7 y TLR9 son capaces de activar la vía MyD88-NFκB induciendo la producción de citocinas inflamatorias. A medida que el lisosoma es transportado hacia la periferia de la célula por

las proteínas asociadas que dirigen su tráfico (Arlb8 para TLR7 y AP3 o LC3 para TLR9), las moléculas accesorias necesarias para la vía MyD88-IRF7 son acopladas al receptor permitiendo la producción de INF tipo I (**Figura 9**).<sup>116</sup> Dada la expresión constitutiva de IRF7 en las pDCs, la producción de INF tipo I está muy favorecida en estas células.<sup>118</sup>



**Figura 9.** Vías de señalización y tráfico intracelular de TLR9. Las distintas partículas de ácidos nucleicos son incorporadas en el interior de la célula mediante endocitosis o fagocitosis. TLR9 entra en contacto con los ácidos nucleicos dentro del endosoma o fagosoma activando la vía MyD88-NFκB que activará la producción de citocinas y quimiocinas. El tráfico del endosoma/fagosoma hacia la periferia de las células por AP3 y LC3, respectivamente, favorece el acoplamiento de las proteínas necesarias para activar la vía MyD88-IRF7 y la producción de INF tipo I. *Tomada de Swiecki M et al., Nat Rev Immunol 2105.*<sup>117</sup>

Otras proteínas que participan en las vías de señalización de los TLRs son PRAT4A que regula el transporte de los TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 a membrana plasmática y endosoma, respectivamente,<sup>119,120</sup> y gp96, proteína miembro de la familia de las HSP endoplasmáticas, esencial para el tráfico de prácticamente todos los TLRs excepto TLR3.<sup>121</sup> Defectos en las proteínas que dirigen el tráfico de receptores y otras proteínas del sistema retículo endoplasmático (RE)-endolisosómico impiden el correcto

## INTRODUCCIÓN

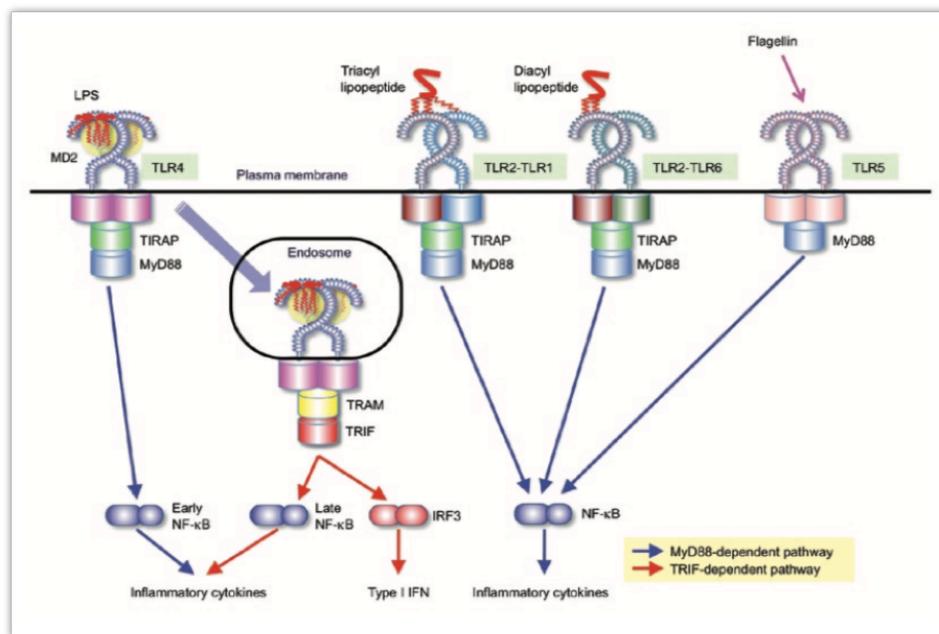
funcionamiento celular<sup>122</sup>. Al contrario, determinados estímulos inflamatorios como los propios ligandos de TLR7 y TLR9, y el propio LPS estimulan tanto la expresión de los receptores como su tráfico celular.<sup>115</sup>

### **2.4. Vías efectoras desencadenadas por los TLRs**

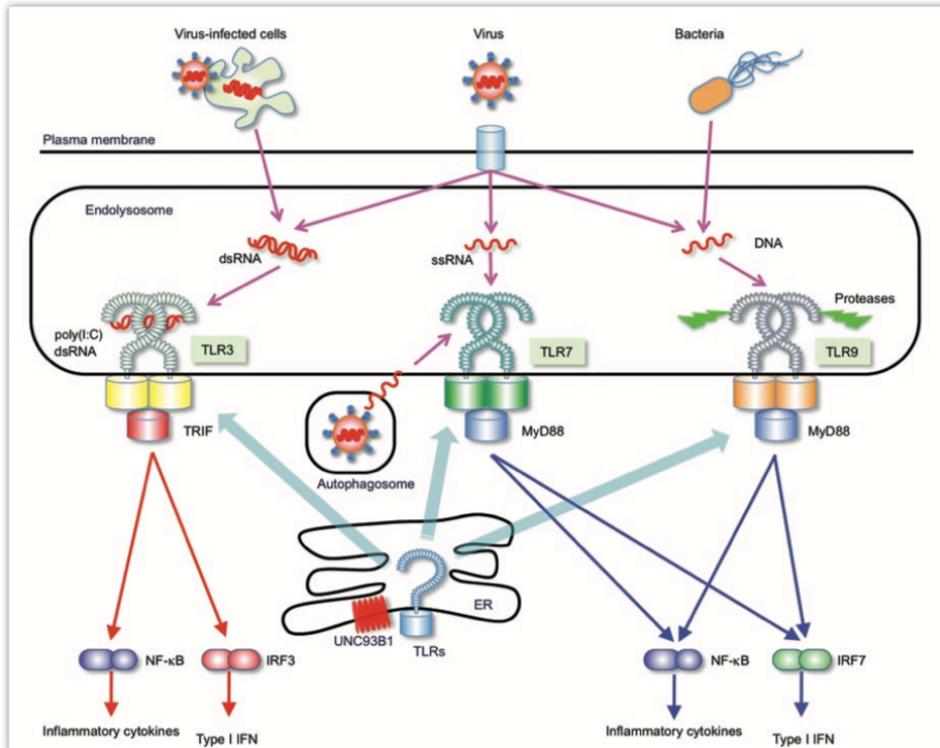
El reconocimiento de PAMPs/DAMPs por los TLRs activará la cascada enzimática y la transcripción de dos vías distintas: la del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la del INF tipo I. Estas vías enzimáticas activarán la producción de citocinas pro-inflamatorias (p.e. IL-6, IL-12), INF tipo I, quimiocinas y proteínas antimicrobianas.<sup>110</sup> El patrón de genes inducidos dependerá del TLR activado y la célula implicada. La especificidad de esta señal puede ser explicada en gran parte por las distintas proteínas auxiliares utilizadas por el dominio intracelular TIR del receptor.<sup>111</sup> Con la activación del receptor, cada TLR utiliza distintas proteínas auxiliares al dominio TIR (p.e. MyD88, TIRAP, TRAM o TRIF) desencadenando respuestas intracelulares específicas para el agente invasor identificado. Además, esta vía de transducción será distinta para cada célula y definirá sus propiedades inmunológicas.<sup>123</sup> Así, la señal transducida no será la misma si el agente agresor se trata de una bacteria Gram-negativa con múltiples lipopolisacáridos en su pared bacteriana (LPS) reconocidos por TLR4 en la membrana plasmática de un macrófago (que al activarse producirá principalmente citocinas pro-inflamatorias), que si se trata de un virus con DNA rico en repeticiones GpC reconocidas por TLR9 en el endosoma de una pDC (que provocará la producción de grandes cantidades de INF tipo I).

Desde el punto de vista molecular, se describen dos vías principales de transducción de señales TLR: la dependiente de MyD88 y la dependiente de TRIF.<sup>111</sup> MyD88 es esencial para la transducción de todos los TLRs excepto para TLR3. La importancia de esta proteína auxiliar se manifiesta en individuos con deficiencia en MyD88 que padecen de múltiples infecciones bacterianas piogénicas. MyD88 junto con otras moléculas adaptadoras asociadas al dominio TIR (p.e. TIRAP) está implicada en la producción de citocinas pro-inflamatorias mediante la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en la gran mayoría de células mieloides activadas por los receptores de superficie celular TLR1/2, TLR2/6, TLR4 (fase activación precoz) y TLR5. Además, MyD88 junto con IRF7 también participa en la producción de INF tipo I en las DCs activadas mediante los receptores intracelulares

TLR7, TLR8 y TLR9. Por otro lado, la vía dependiente de TRIF es utilizada de manera exclusiva por TLR3 y complementariamente por TLR4 (fase activación tardía). Esta vía es capaz de activar tanto la producción de citocinas mediante la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B como la producción de INF tipo I mediada por IRF3 (ver **figura 10** y **figura 11**).



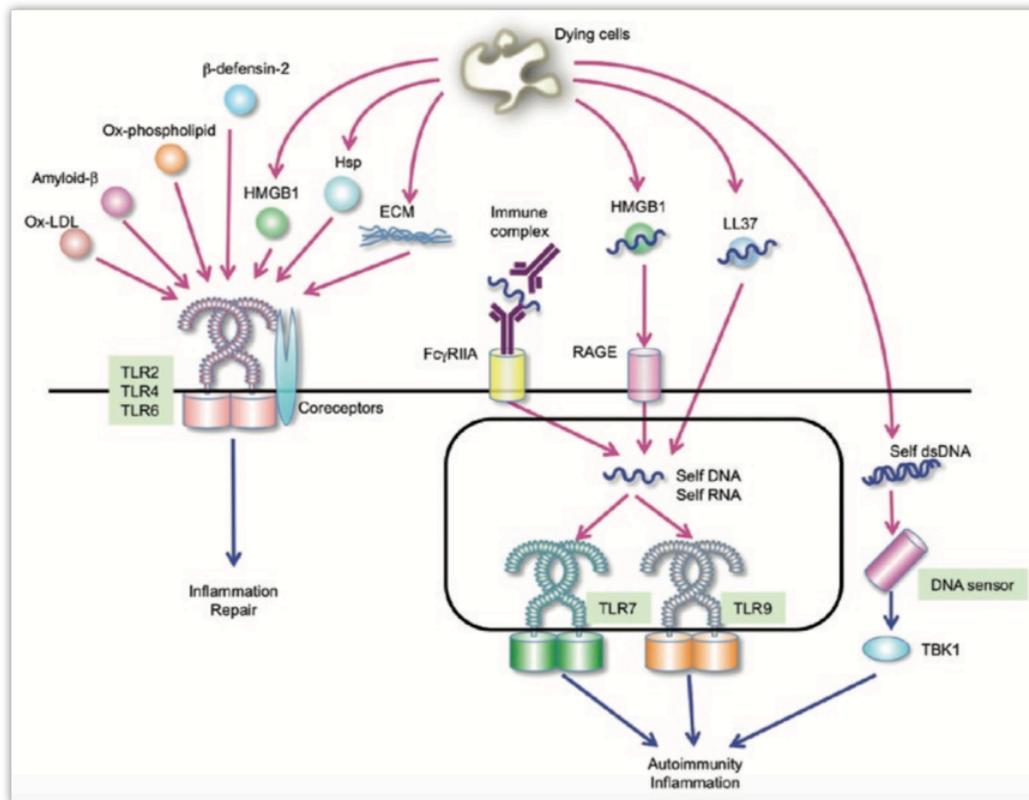
**Figura 10.** Transducción de señales de los TLRs de superficie celular, responsables de reconocer PAMPs asociados a pared microbiana (bacterias, virus, hongos y parásitos). TLR2 forma heterodímeros con TLR1 o TLR6 para el reconocimiento de lipopéptidos triacil y diacil respectivamente. TLR5 forma homodímeros para el reconocimiento de flagelina, proteína constituyente del flagelo bacteriano. Estos receptores capaces de reconocer PAMPs asociados a pared microbiana, utilizan la vía dependiente de MyD88 para promover la translocación de NF- $\kappa$ B y la producción de citocinas inflamatorias. Por otro lado, los homodímeros de TLR4 utilizan inicialmente la vía dependiente MyD88 (fase de activación precoz) y posteriormente, tras ser endocitados, activan la vía dependiente de TRIF que promoverá la translocación de IRF3 y la producción de INF tipo I (fase de activación tardía). Tomada de Kawai et al. *Nat Immunol* 2010.<sup>111</sup>



**Figura 11.** Transducción de señales de los TLRs intracelulares, responsables de reconocer PAMPs presentes en los ácidos nucleicos de virus, bacterias y otros patógenos. TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 son transportados del RE a los endolisosomas donde son capaces de reconocer RNA de cadena doble (dsRNA) y simple (ssRNA) y repeticiones GpC-DNA, respectivamente. Su activación conduce a la translocación de NF-κB e IRF7 para la producción de citocinas inflamatorias e INF tipo I. Tomada de Kawai et al. *Nat Immunol* 2010.<sup>111</sup>

### 2.5. Ligandos endógenos de los TLRs

Cada vez son más las moléculas endógenas descritas capaces de unirse y desencadenar una respuesta inflamatoria mediada por TLRs (ver **figura 12**). La mayoría de estas moléculas que actuarían como DAMPs son producto de la muerte celular, del daño tisular o de células neoplásicas, incluyendo productos de la degradación de la EMC (p.e., ácido hialurónico, biglicanos, versican, extradominio-A de la fibronectina), la proteína surfactante-A, lipoproteínas de baja densidad oxidadas y amiloide-β o proteínas liberadas tras la muerte celular como las HSP o HMGB1.<sup>111</sup> La activación de los TLRs por DAMPs ha sido implicada en daño tisular pulmonar, shock séptico, reperfusión tras un evento isquémico, aterosclerosis y enfermedad de Alzheimer.<sup>124-127</sup> Finalmente, destacar que moléculas propias inducidas en la infección como el AMP β-defensin2 son capaces de estimular los TLR4 para activar mDCs y promover una respuesta inmunitaria adaptativa.<sup>128</sup>



**Figura 12.** Agonistas endógenos de los TLRs y enfermedad. Las moléculas endógenas liberadas por las células dañadas como HMBG1, HSP y componentes de la matriz extracelular (EMC) son reconocidas por los TLR2 TLR4 o TLR2 y TLR4. El β-amiloide y las LDL oxidadas (Ox-LDL) son reconocidas por TLR4 y TLR6 junto con el coreceptor CD36. Los fosfolípidos oxidados generados tras la infección y el AMP β-defensina2 son reconocidos por TLR4. El reconocimiento de estas moléculas endógenas por los TLRs de superficie activa las vías celulares de inflamación y reparación. Los ácidos nucleicos propios (DNA y RNA) formando complejos con LL37 son internalizados en los endosomas y reconocidos por TLR9 y TLR7, respectivamente. El complejo HMBG1-DNA endógeno es internalizado vía RAGE y reconocido por TLR9. Los ICs formados por Acs y ácidos nucleicos propios son internalizados mediante FcγRIIA y son capaces de activar TLR7 y TLR9. Esta activación junto con la colaboración de otros receptores sensores de ácidos nucleicos aún por definir promueve la producción de INF tipo I y la aparición de enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias. Tomada de Kawai *et al. Nat Immunol* 2010<sup>111</sup>

Mención aparte merecen los ácidos nucleicos propios como ligandos de los TLRs. En condiciones normales, los ácidos nucleicos propios no son capaces de activar los TLRs sensibles a éstos por distintos motivos; a) su localización exclusivamente intracelular,<sup>122</sup> b) su expresión altamente regulada,<sup>115</sup> c) la dependencia de un microambiente propio del endolisosoma,<sup>122</sup> d) la “maduración” proteolítica necesaria para formar un TLR funcional,<sup>122</sup> y e) el papel de las nucleasas que degradan rápidamente los ácidos nucleicos propios liberados en el medio extracelular. La alteración de estos mecanismos de seguridad contribuye a la aparición de procesos inflamatorios y autoinmunitarios. Por ejemplo, tan solo una mayor expresión de los receptores TLR7 y 8 facilita su activación y propicia la

## INTRODUCCIÓN

aparición de fenómenos autoinmunitarios.<sup>129,130</sup> Incluso, la propia inflamación mediada por la presencia de LPS y por INF- $\gamma$  estimula la expresión de TLR9 y favorece su activación.<sup>131</sup>

En el LES, los inmunocomplejos (ICs) formados por anticuerpos (Acs) anti-ácidos nucleicos propios estimulan las pDCs a producir grandes cantidades de INF tipo I. Estos ICs fagocitados vía Fc $\gamma$ RIIa y liberados en los endosomas en presencia de TLR7 y 9,<sup>132,133</sup> protegen los ácidos nucleicos propios de las nucleasas extracelulares y facilitan su internalización, permitiendo la activación aberrante de los TLRs intracelulares. Del mismo modo, como sucede en Psoriasis, el AMP LL37 también protege los ácido nucleicos y permite su internalización en los endolisosomas celulares.<sup>74</sup> Otra vía para la internalización de los ácido nucleicos propios al endosoma está mediada por HMBG1 y el receptor de productos altamente glicosilados RAGE.<sup>134</sup> La activación de los TLRs intracelulares en las pDCs provocará la producción de grandes cantidades de INF tipo I, una respuesta inmunitaria adaptativa celular Th1 y la característica “dermatitis de interfase” lúpica.<sup>135</sup> Por otro lado, estos mismos ICs internalizados en las células B, estimularán sus TLRs y promoverán la proliferación de células B autoreactivas y la producción de autoAcs anti-nucleares.<sup>136</sup> La aparición de estos Acs autoreactivos precipitará la aparición de otras manifestaciones propias del LES. Así, la cooperación entre estas dos estirpes celulares, (pDCs y células B) contribuye a la progresión y perpetuación de la enfermedad. Como denominador común, los TLRs intracelulares desarrollan una función clave en la enfermedad lúpica, hecho bien establecido en modelos animales de lupus y congruente con los hallazgos en genética y patogenia de la enfermedad.<sup>137</sup> De hecho, los fármacos antimaláricos como la cloroquina y la hidroxicloroquina forman parte del tratamiento de la enfermedad lúpica al interferir en el reconocimiento de los ácidos nucleicos propios por los TLR intracelulares.<sup>138</sup>

### 2.6. TLRs en Psoriasis

Teniendo en cuenta el importante papel de los TLRs como receptores centinela y activadores de la inflamación ante una señal de peligro en forma de PAMP/DAMP, estos receptores podrían estar implicados en el fenómeno inflamatorio de la Psoriasis,

principalmente en la fase de inducción pero también en la fase efectora participando así en la aparición y en las exacerbaciones de la enfermedad. Concretamente, en Psoriasis, los TLRs están implicados en:

- 1) la activación del queratinocito para producir citocinas implicadas en la enfermedad tras el reconocimiento de PAMPs/DAMPs,
- 2) la activación de las DCs (pDCs y mDCs) tras el reconocimiento de ICs formados por LL37 y DNA/RNA propio, y
- 3) en la promoción del eje IL-23/Th17 induciendo la producción de IL-23 en DCs y macrófagos.

En primer lugar, múltiples estudios han demostrado la expresión constitutiva de TLR1-5 y TLR9 en los queratinocitos.<sup>62,139</sup> Además, los estudios inmunohistoquímicos muestran una alteración en la distribución y expresión de los TLRs en las placas de psoriasis, con aumento de la expresión de TLR2 y disminución de TLR5.<sup>140,141</sup> La propia presencia de estos receptores en los queratinocitos sugiere que éstos actúan (al igual que en las DCs) como centinelas en la piel, y capacitan al queratinocito a responder frente a los ligandos de los TLRs y promover la inflamación.<sup>109</sup> En este sentido, Morizane et al.<sup>142</sup> demostraron cómo los queratinocitos de las placas de psoriasis sobreexpresan TLR9 en comparación con la piel sana o la atópica, que dicha expresión está inducida por LL37 y que ello capacita al queratinocito a producir grandes cantidades de INF- $\beta$  en presencia de DNA genómico o pequeños fragmentos de CpG. De ello se concluye que el queratinocito, la estirpe celular más importante y numerosa de la piel, participa de manera activa en la promoción de la inflamación en Psoriasis.

En segundo lugar, múltiples investigaciones han demostrado que los TLRs intracelulares, principalmente TLR7, TLR8 y TLR9, juegan un papel crucial en la activación y respuesta inflamatoria de las DCs en Psoriasis. Las pDCs expresan de manera selectiva TLR7 y TLR9 mientras que las mDCs expresan TLR3 y TLR8.<sup>143</sup> Estos receptores sensores de ácidos nucleicos participan en las fases iniciales de la activación del SI y en la pérdida de la tolerancia a antígenos propios. En efecto, complejos formados por el AMP LL37 (intensamente producido por queratinocitos y neutrófilos en las placas de psoriasis) y DNA propio liberado por células necróticas son capaces de activar los TLR9 de las pDCs e

## INTRODUCCIÓN

inducir la producción masiva de INF tipo I.<sup>74,77</sup> Al igual que en el LES, LL37 ensambla y protege al DNA propio de tal modo que escapa de los mecanismos reguladores fisiológicos (p.e. degradación por nucleasas extracelulares), facilita su internalización y posibilita la activación de los TLRs intracelulares sensores de ácidos nucleicos.<sup>53</sup> Los mecanismos por los que estos ácido nucleicos consiguen burlar los mecanismos fisiológicos y romper con la tolerancia inmunológica frente a antígenos propios son complejos y no del todo conocidos.

Del mismo modo, el RNA propio también es capaz de formar complejos con LL37, protegerse de la degradación enzimática, acceder a los compartimentos endolisosómicos y activar TLR7 y TLR8 presentes en las pDCs y mDCs, respectivamente.<sup>77</sup> La activación de TLR7 en las pDCs desencadenará la producción de más INF tipo I mientras que la activación de TLR8 en las mDCs provocará la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  y la maduración de las propias mDCs, clave para la fase efectora de la Psoriasis por su capacidad de dirigir una respuesta adaptativa Th1/Th17. Con ello, de nuevo se rompe la tolerancia inmunológica frente a antígenos propios y se contribuye a una mayor respuesta inflamatoria en la enfermedad.

Aún no se conocen con exactitud cómo los TLRs intracelulares sensores de ácidos nucleicos son capaces de distinguir entre DNA/RNA microbiano del humano. La gran mayoría de autores sí coincide en señalar que la localización intracelular de los receptores es clave para tal fin.<sup>144</sup> Habitualmente, la presencia de múltiples repeticiones de nucleótidos CpG presentes en el DNA microbiano evita su degradación y favorece su accesibilidad al endosoma y la activación del TLR intracelular. Sin embargo, el DNA humano con menos repeticiones CpG suele ser degradado por DNAsas (tanto en el medio extracelular como en el propio endosoma), lo que dificulta su acceso al receptor.<sup>144</sup> Otros mecanismos implicados en evitar la detección de DNA/RNA propio son el procesamiento proteolítico de los TLRs intracelulares para su activación en el propio endosoma, la regulación de la expresión de los propios TLRs y un *clearence* deficiente de DNA/RNA propios.<sup>122</sup> En Psoriasis, la intensa producción de LL37 por queratinocitos y neutrófilos en la piel y la mayor expresión de TLR9 inducida por INF- $\gamma$  facilita la evasión de los mecanismos de regulación y la aberrante activación inflamatoria. En efecto, la gran cantidad de LL37 en Psoriasis, hecho diferencial con otras patologías cutáneas,<sup>142</sup> evita la

degradación y facilita el acceso de DNA propio en los endolisosomas permitiendo así la activación de TLR9 en las pDCs. Además, la capacidad de la pDC en retener los ácidos nucleicos endocitados y la expresión constitutiva de IRF7 que media la señal, propicia la producción de grandes cantidades de INF tipo I.<sup>145</sup> A su vez, esta producción de INF tipo I junto con los complejos LL37-RNA propio, potencian la maduración de las mDCs y la producción de citocinas inflamatorias. Todo ello favorece la inflamación, el desarrollo de una respuesta inmunitaria adaptativa y la autoinmunidad.<sup>146</sup>

En tercer lugar, varios TLRs se han relacionado con la producción de IL-23 e IL-17 y la potenciación de una respuesta IL-23/Th17, el eje patogénico más relevante en Psoriasis.

Como se describe en el apartado *1.8.3.2 Fase efectora* de la introducción, las mDCs productoras de IL-23 son capaces de activar un subgrupo de células  $T\gamma\delta^+$  a producir importantes cantidades de IL-17.<sup>79</sup> En este sentido, Massot et al.<sup>147</sup> demostraron como las DCs activadas mediante TLR4 producen IL-23 e IL-1 $\beta$  que, a su vez, inducen a las células  $T\gamma\delta^+$  a secretar importantes cantidades de IL-17 e IL-22. Los mismos autores demostraron cómo en modelos murinos, la estimulación de las DCs con imiquimod (un análogo de TLR7) era suficiente para activar estas células  $T\gamma\delta^+$  e inducir la secreción de IL-17 e IL-22. Kinnebrew et al.<sup>148</sup> observaron como la activación de las DCs de la lámina basal a través de TLR5 inducía la producción de IL-23, que eventualmente podría activar las células  $T\gamma\delta^+$ .<sup>79</sup> La propia IL-17, mediante un mecanismo de *feedback* positivo favorecería la polarización de más células T CD4+ hacia el eje IL-23/Th17. Finalmente, He et al.<sup>149</sup> demostraron en otro trabajo cómo HMGB1 era capaz de activar TLR2 y promover así una respuesta Th17 en pacientes con AR. Incluso la activación de los receptores  $\beta$ 2 puede modular la producción de citocinas en las DCs estimuladas por TLR2 y favorecer una respuesta inmunitaria adaptativa Th17, hecho que señala el estrés como factor desencadenante en Psoriasis.<sup>150</sup>

Cabe destacar que la importancia de los TLRs intracelulares TLR7, 8 y 9 en la fisiopatogenia de la Psoriasis ha sido contrastada en 2 modelos murinos. En el primer modelo, imiquimod, un agonista TLR7, es capaz de inducir lesiones psoriasiformes mediante la activación de las DCs, la producción inicial de IFN- $\alpha$ , IL-1, IL-6, G-CSF, IL-

## INTRODUCCIÓN

23 y posteriormente de IL-17 e IL-22.<sup>151</sup> En el segundo modelo de Psoriasis inducida por IL-23, antagonistas de los tres TLR7, 8 y 9 son capaces de suprimir la respuesta Th1 y Th17 y revertir las lesiones cutáneas de psoriasis.<sup>152</sup>

Por último, el papel de estos receptores en la fisiopatogenia de la Psoriasis ha motivado el desarrollo de antagonistas de los TLRs para su tratamiento. Hasta la fecha, dos moléculas (IMO-3100 antagonista de TLR7 y 9, y IMO-8400 antagonista de TLR7, 8 y 9) han sido testadas con éxito en el tratamiento de las placas de psoriasis en ensayos clínicos fase II<sup>153</sup> y otras moléculas similares en desarrollo podrían representar en un futuro próximo nuevas opciones terapéuticas para la Psoriasis.<sup>154</sup>

### **2.7. Polimorfismos de *TLRs* en patología infecciosa e inflamatoria**

Existen múltiples polimorfismos genéticos que tienen un impacto directo en la función de los distintos TLRs, y otros polimorfismos que alteran la transcripción y/o ensamblaje del receptor. Por ejemplo, el SNP rs4986790 que afecta al ectodominio de TLR4 impide la señalización del receptor tras su unión con su ligando LPS.<sup>155</sup> Estos polimorfismos tienen una importante repercusión clínica y, de hecho, han sido relacionados con distintas enfermedades infecciosas, inflamatorias y autoinmunitarias. Esta relación se establece principalmente como factor de susceptibilidad o modificador de la enfermedad.<sup>113,156,157</sup>

Por su impacto funcional y su asociación con distintas enfermedades infecciosas, inflamatorias y autoinmunitarias, los polimorfismos de TLRs más ampliamente estudiados son los que se incluyen en la **tabla 2**. Todos ellos han sido analizados en la presente Tesis Doctoral.

**Tabla 2.** Polimorfismos de TLRs más ampliamente analizados en la literatura científica médica.

SNP ID	Gen	Cr	Localización	Cambio nucleotídico	Cambio aminoácido	Impacto en el receptor
rs121917864	<i>TLR2</i>	4	Exon 2	c.2029C>T	p.R677W	Hipomórfico <sup>158</sup>
rs5743708			Exon 2	c.2258G>A	p.R753Q	Hipomórfico <sup>159</sup>
rs3775291	<i>TLR3</i>	4	Exon 4	c.1234C>T	p.L412F	Hipomórfico <sup>160</sup>
rs3775296			5' UT	c.-7C>A	Sin traducción	Disminución actividad transcripcional <sup>161</sup>
rs4986790	<i>TLR4</i>	9	Exon 4	c.896A>G	p.D299G	Hipomórfico <sup>162</sup>
rs4986791			Exon 4	c.1196C>T	p.T399I	Hipomórfico <sup>162</sup>
rs5744168	<i>TLR5</i>	1	Exon 6	c.1174C>T	p.R392>Stop	Amórfico <sup>163</sup>
rs179008	<i>TLR7</i>	X	Exon 3	c.32A>T	p.Q11L	Hipomórfico <sup>164</sup>
rs352140	<i>TLR9</i>	3	Exon 2	c.2848G>A	p.P545P	Aumento actividad transcripcional <sup>165</sup>
rs5743836			5' UT	c.-1237T>C	Sin traducción	Aumento actividad transcripcional <sup>166</sup>
rs187084			5'UT	c.-1486T>C	Sin traducción	Aumento actividad transcripcional <sup>166</sup>

Abreviaturas: SNP = *Single nucleotide polymorphism*; ID = identificación; Cr = cromosoma; TLR = receptor *toll-like*; Amórfico = pérdida completa de función; Hipomórfico = pérdida parcial de función. Nucleótidos: C = citosina; T = timina; G = guanina; A = adenosina; Aminoácidos: R = asparagina; W = triptófano; Q = glutamina; L = leucina; F = fenilalanina; D = aspártico; G = glicina; T = tirosina; I = isoleucina; P = prolina; Amórfico = pérdida completa de función; hipomórfico = pérdida parcial de función.

En patología infecciosa, los polimorfismos más estudiados pertenecen a los TLRs de superficie TLR1, TLR2 y TLR4. Distintos SNPs de estos receptores se han asociado a una mayor susceptibilidad de padecer enfermedades infecciosas como la infección por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, infecciones fúngicas y parasitarias, tuberculosis, shock séptico, etc.<sup>156</sup> Por otro lado, las enfermedades infecciosas asociadas a los polimorfismos de los TLRs intracelulares son de índole vírica y otros agentes microbianos intracelulares.<sup>156</sup>

## INTRODUCCIÓN

Existen pocos estudios que relacionen de manera consistente los polimorfismos genéticos de TLRs con la enfermedad inflamatorias/autoinmunitarias. Los procesos autoinmunitarios más ampliamente estudiados en este aspecto son el LES y la AR. Es de destacar, la importante asociación entre varios polimorfismos de TLRs intracelulares como *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* con el LES.<sup>167</sup> En AR, múltiples estudios experimentales han demostrado la implicación de los TLRs en su patogenia, y la enfermedad ha sido relacionada de manera convincente con polimorfismos de *TLR2*, *TLR4* y *TLR9*.<sup>149,168-170</sup> Finalmente, apuntar que *TLR7* y *TLR8* han sido protagonistas asiduos en los estudios de Asma bronquial<sup>164,171</sup>, y que *TLR2* parece desarrollar un importante papel en la fisiopatogenia de la Esclerosis Sistémica,<sup>172</sup> junto con *TLR4* y los TLRs intracelulares *TLR3*, *8* y *9*.<sup>173,174</sup>

Estos receptores fueron seleccionados por nuestro grupo de investigación a tenor de su relevante papel en la fisiopatogenia de la Psoriasis. En el momento del diseño y ejecución de la presente Tesis Doctoral, no existía ningún estudio que analizara los polimorfismos de los *TLRs* como posible factor de susceptibilidad o modificador de la enfermedad en Psoriasis, ni como factor predictivo de respuesta del tratamiento con fototerapia UVBnb. Actualmente, existen tres estudios que analizan esta relación en distintas poblaciones, incluyendo poblaciones de Gran Bretaña, China y Polonia,<sup>175-177</sup> cuyos resultados se abordarán en el apartado *Discusión*.

### 3. Receptores linfocitarios CD5 y CD6 y patología inmunomediada.

#### 3.1. Introducción

Los receptores linfocitarios CD5 y CD6 son dos glicoproteínas transmembrana físicamente asociadas al receptor clonotípico de las células T (TCR) y célula B (BCR). Como receptores co-señalizadores, son capaces de modular la respuesta antígeno (Ag)-específica mediada por TCR/BCR en la sinapsis inmunológica e influir en la activación, proliferación y supervivencia de los linfocitos.<sup>178,179</sup> Además, CD5 y CD6 son capaces de reconocer por sí mismos PAMPs altamente conservados en la evolución y, por ello, se clasifican dentro del grupo de PRRs, concretamente en la superfamilia de los receptores tipo *scavenger* (basureros o carroñeros) ricos en cisteína (SF-SRCR).<sup>180</sup>

Estos dos receptores guardan una alta homología estructural y funcional, y teniendo en cuenta que sus genes están localizados contiguamente en el cromosoma 11, se postula que ambos proceden de la duplicación de un gen ancestral común, por lo que su estudio debe abordarse en base al conocimiento mutuo.<sup>181</sup>

Ambos receptores se expresan en todas las células T y en un subtipo de célula B, denominadas células B1a. Si bien poseen un cierto carácter dual, ambos receptores son considerados inhibitorios ya que modulan negativamente la respuesta mediada por TCR y BCR.<sup>182</sup> La complejidad de estos receptores les otorga múltiples funciones inmunológicas entre las que se incluyen la selección y desarrollo de los timocitos, la diferenciación y hemostasis de los linfocitos, la generación de células T y B reguladoras competentes (Tregs y Bregs, respectivamente) y un papel relevante en la modificación de la respuesta inmunitaria anti-neoplásica y la autoinmunidad.<sup>183,184</sup>

CD5 fue uno de los primeros receptores linfocitarios en ser descritos en la literatura científica. En 1968, Boyse et al.<sup>185</sup> caracterizaron este receptor, pero no fue hasta 1982 que se le asignó su nombre oficial durante una conferencia sobre antígenos humanos de diferenciación leucocitaria celebrada en París. Posteriormente, el estudio de este receptor se intensificó gracias al desarrollo de las técnicas de inmunogenética.<sup>186</sup> CD6 fue

## INTRODUCCIÓN

descubierto más tarde en 1981<sup>187</sup> y ya en 1995 se codificó la secuencia completa del cDNA de CD6 humano.<sup>188</sup> En la actualidad, CD5 pero principalmente CD6 son objeto de estudio en distintos grupos de investigación dada su importancia en la respuesta inmunitaria, tanto innata pero principalmente adaptativa. Su papel como reguladores de la respuesta celular antineoplásica y en patología autoinmunitaria ha despertado un gran interés, y de hecho, estos receptores se han convertido en dianas terapéuticas en distintas disciplinas médicas como la oncología, la neurología y la dermatología.<sup>189-191</sup> En efecto, la modificación de la respuesta mediada por CD5 y CD6 está siendo explorada en miras de desarrollar tratamientos inmunodirigidos, y prueba de ello es el nuevo fármaco biológico anti-CD6 (itolizumab) ensayado en psoriasis y otras enfermedades inflamatorias.<sup>192-195</sup>

### 3.2. Receptor linfocitario CD5

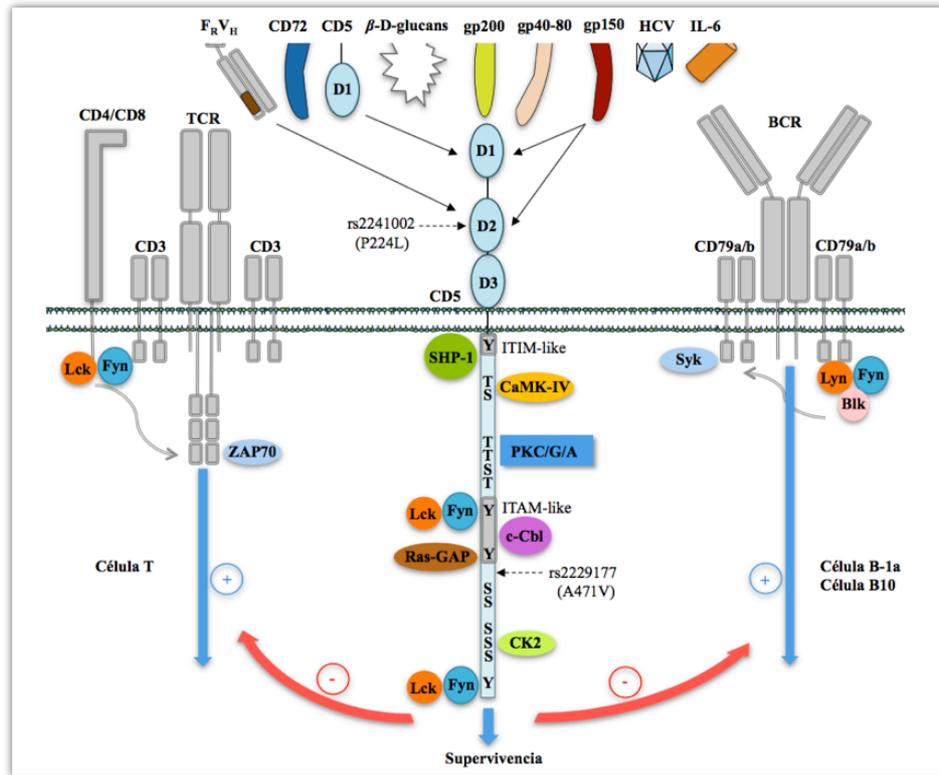
#### 3.2.1. Estructura, expresión y ligandos de CD5

CD5 es un receptor monomérico formado por una glicoproteína de membrana tipo I de 67 kDa perteneciente a la SF-SRCR y constituido por una región extracelular con 3 dominios SRCR tipo B (D1, D2 y D3), una región transmembrana y otra citoplasmática encargada de la transducción de señales (**figura 1**).<sup>196</sup> El dominio citoplasmático carece de actividad catalítica intrínseca pero presenta distintos motivos con residuos Ser, Thr y Tyr susceptibles de ser fosforilados por Ser/Thr-cinasas (como PKC, CaMK-II, CK2) y Tyr-cinasas (como Lck y Fyn) y convertirse en puntos de anclaje para distintas proteínas transductores de señales entre las que se incluyen enzimas a) pro-activadoras como Lck, PI3K, CaMKII o PKC implicadas en la transcripción de genes pro-inflamatorios como IL-2/IL-2R, b) reguladoras negativas como c-Cbl, Ras-GAP, SHP-1, que modulan negativamente la respuesta de TCR/BCR, y c) CK2, implicada en la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis.<sup>178</sup>

Este receptor se expresa en todas las células T (tanto del linaje  $\alpha\beta$  como  $\gamma\delta$ ) y en una subpoblación de células B denominada B1a, implicadas en la producción de Ac polireactivos de baja afinidad y en procesos autoinmunes (p.e. el LES, la AR o la DM tipo I) y linfoproliferativos (p.e. la leucemia linfocítica crónica, la leucemia de células peludas o el linfoma del manto).<sup>197</sup> Durante el desarrollo de los timocitos, CD5 se expresa muy

precozmente y ejerce un importante papel en los procesos de selección negativa/positiva de las células T. En periferia, el nivel de expresión de CD5 es variable, y en orden decreciente se expresa en células T CD4<sup>+</sup> TCRαβ > células T CD8<sup>+</sup> TCRαβ > células TCRγδ (a excepción de las células localizadas en el epitelio intestinal que son CD5<sup>-</sup>) y por último en las células B1a.<sup>198</sup> Las células T y B con mayor expresión de CD5 son las células con función reguladora (Tregs y Bregs)<sup>199</sup> y las células anérgicas resultantes de la estimulación crónica por Ag endógenos o exógenos.<sup>200</sup>

Entre los ligandos endógenos descritos de CD5 se incluyen CD72 (expresado en células B), gp35-37, gp77-80, gp150, la región *framework* IgV<sub>H</sub> de las inmunoglobulinas y el propio CD5 que se unen a los distintos dominios SRCR del receptor (**figura 13**).<sup>196</sup> Sin embargo, muchos de estos ligandos no están bien caracterizados, su papel fisiológico mal descrito y no han sido replicados por otros grupos de investigación. Aunque también cuestionado recientemente<sup>201</sup> se ha descrito a IL-6 como ligando de CD5 en células B1a, hecho que favorecería su proliferación y eventualmente una respuesta antitumoral defectuosa.<sup>202</sup> Como PRR, CD5 es capaz de reconocer con una alta afinidad PAMPs presentes en la partícula fúngica zimosan como son los β-glucanos, de forma análoga a lo reportado para Dectin-1, el principal receptor de β-glucanos en células hematopoyéticas.<sup>203</sup> Además, CD5 parece ser necesario para la entrada del virus de la hepatitis C en células T<sup>204</sup> por lo que podría ser capaz de reconocer también otros virus al igual que otros receptores de la SRCR-SF.



**Figura 13.** Representación esquemática de las interacciones extracelulares e intracelulares mediadas por CD5. Los flechas indican el dominio extracelular al que se une cada ligando. Las moléculas transductoras de señales intracelulares que se asocian a CD5 aparecen yuxtapuestas a los residuos fosforilables Tyr (Y), Ser (S) y Thr (T) con los que interaccionan. Tomada de *Consuegra M et al, Crit Rev Immunol 2015*<sup>197</sup>.

### 3.2.2. Funciones inmunológicas de CD5

Dada su naturaleza y capacidad de unión a distintos ligandos y la gran diversidad de señales capaz de transmitir, este receptor presenta múltiples funciones inmunológicas que se detallan a continuación.

#### 3.2.2.1. CD5 como modulador de la respuesta Ag-específica de TCR/BCR

El receptor CD5 está físicamente asociado al receptor Ag-específico de células T y B (TCR y BCR) formando parte del complejo supramolecular de activación de la sinapsis inmunológica. Ello permite a CD5 ejercer como receptor accesorio y modular la señal principal mediada por TCR/BCR mediante su asociación a las proteínas señaladoras anteriormente descritas.<sup>182</sup>

Inicialmente se pensó que CD5 era un receptor co-estimulador.<sup>205</sup> Sin embargo, estudios con ratones deficientes en CD5 (CD5<sup>-/-</sup>) evidenciaron su capacidad de modular negativamente las señales de activación y diferenciación mediadas por TCR/BCR.<sup>182</sup> En efecto, los timocitos de ratones CD5<sup>-/-</sup> se mostraron hiper-respondedores a la estimulación vía TCR evidenciado por una mayor movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular y fosforilación de proteínas transductoras de señales.<sup>206</sup> Las células B1a de ratones CD5<sup>-/-</sup> también mostraron una mayor activación vía BCR, mayor resistencia a la apoptosis y una proliferación aumentada.<sup>207</sup>

En el timo, CD5 juega un papel fundamental en la selección y supervivencia de los timocitos al modular el umbral de activación de TCR durante los procesos de selección positiva y negativa, y promover la supervivencia celular (ver más adelante).<sup>208</sup> En la periferia, la expresión en membrana de CD5 sigue siendo clave para modular el umbral de activación tanto vía TCR como BCR en las células T y B1a, respectivamente; es decir, una menor expresión de CD5 en membrana disminuirá el umbral de activación vía TCR/BCR.<sup>209</sup>

#### **3.2.2.2. CD5 en la polarización de las células T CD4+**

CD5 también parece ser importante en la diferenciación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Estudios con el modelo experimental de encefalitis autoinmune (EAE) en ratones con delección específica para la unión de CK2 en la cola citoplasmática de CD5 demostraron que dichos ratones presentaban formas menos severas de la enfermedad y una menor polarización de células patogénicas T CD4+ en Th2 y Th17.<sup>210</sup> Más específicamente, de Wit et al.<sup>211</sup> observaron cómo CD5 a través de la expresión del receptor IL-23 ejercía un estímulo persistente para la polarización de células T naïve en Th17. Finalmente, McGuire et al.<sup>212</sup> describieron el mecanismo molecular a través del cual CD5 participaba en la polarización Th17. Estos trabajos demuestran un papel relevante de la señal mediada por CD5-CK2 en la polarización de las células T CD4+ en Th17, estirpe celular clave en la fisiopatogenia de la psoriasis.

## INTRODUCCIÓN

### 3.2.2.3. *CD5 en la supervivencia del linfocito*

Las primeras evidencias del importante papel de CD5 en la supervivencia de las células T y B1a se obtuvieron en modelos de EAE con ratones CD5<sup>-/-</sup>. Las células T de estos ratones eran incapaces de sobrevivir tras su activación y proliferación y entraban en apoptosis por AICD (*activated induced death cell*).<sup>213</sup> Consecuentemente, los ratones presentaban una forma leve y retardada de la enfermedad. En un segundo estudio, se observó que la muerte celular inducida en células T CD8<sup>+</sup> sensibilizadas a Ag tumorales era inversamente proporcional a la expresión de CD5.<sup>214</sup> De acuerdo con el papel regulador negativo de CD5, las células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumor con menor expresión de CD5 mostraron una mayor respuesta anti-tumoral pero a su vez una menor supervivencia celular por AICD, por lo que la respuesta anti-tumoral resultante era menos eficaz.<sup>214</sup> En el timo, el importante papel que desarrolla CD5 no solo se explica porque modula el umbral de activación de TCR sino porque también determina la supervivencia del timocito, permitiendo a la célula T en desarrollo ser seleccionada y además, sobrevivir.<sup>215</sup>

El mecanismo intracelular por el que CD5 favorece una mayor supervivencia no se conoce bien pero implica a las proteínas transductoras de señales CK2, PIK3 y Akt que activarían proteínas pro-supervivencia como Bcl-2 o Bcl-xl, y la inhibición de proteínas pro-apoptóticas como caspasas, FasL y Bid.<sup>199,212,216,217</sup> Por otro lado, la supervivencia en las células B1a requiere un estímulo persistente Ag-específico mediado por BCR y la producción de IL-10 dependiente de CD5; en ausencia de CD5, la producción de IL-10 disminuye y la activación persistente de BCR induce la muerte celular de las células B1a.<sup>178</sup>

### 3.2.2.4. *CD5 en la tolerancia inmunológica*

CD5 también tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica ya que participa en la selección y maduración de los timocitos en desarrollo influyendo en el control de la reactividad frente a Ag propios. Este hecho es especialmente importante para las células Tregs.<sup>208</sup> Éstas son seleccionadas por la gran avidéz de su TCR por el Ag, por lo que requieren de la presencia de CD5 para modular la activación de TCR, favorecer su supervivencia y permitir su desarrollo. Por ello, la intensa expresión de CD5

es un rasgo característico de las células Tregs.<sup>199</sup> Además, CD5 capacita a las Treg para ser funcionalmente competentes.<sup>199</sup>

Por otro lado, la mayor expresión de CD5 tanto en células T como B periféricas se asocia a una anergia en la respuesta Ag-específica.<sup>218</sup> Henderson et al. observaron como una elevada expresión de CD5 favorecía el desarrollo de Tregs y favorecía la tolerancia inmunológica en células T autoreactivas.<sup>219</sup> Por ello, la regulación de la expresión de CD5 representa un mecanismo de inducción de tolerancia inmunológica. Al contrario, un déficit en la señal mediada por CD5-CK2 puede comprometer la supervivencia de células T autoreactivas y fracasar en el desarrollo de un proceso de autoinmunidad. Este hecho ha sido demostrado en un modelo murino de EAE en el que las células T autoreactivas con respuesta CD5-CK2 deficitaria presentaban una menor supervivencia en comparación con los ratones *wild type* y, en consecuencia, una menor capacidad de desarrollar la enfermedad.<sup>216</sup>

Por último, señalar que la alta expresión de CD5 también es una característica de las células B1a reguladoras, actualmente denominadas B10 por su capacidad de producir IL-10.<sup>220</sup> Quizá la importancia de CD5 tanto en las células Tregs (como Bregs) sea uno de los motivos por los que los ensayos preliminares con terapias anti-CD5 en enfermedades inmunomediadas hayan fracasado.

### 3.2.2.5. CD5 como PRR

Los ectodominios SRCR de CD5 son capaces de reconocer PAMPs propios de hongos como los  $\beta$ -glucanos presentes en las partículas de zimosan y en las paredes celulares de múltiples especies fúngicas como son *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. El reconocimiento de estas moléculas provoca la activación de la vía MAPK y la producción de citocinas proinflamatorias.<sup>178</sup>

En conclusión, desde un punto de vista inmunológico, el receptor linfocítico CD5 es un receptor regulador de la respuesta inmunitaria de carácter multifuncional. Por un lado,

## INTRODUCCIÓN

interviene a) en la modulación de la respuesta mediada por TCR y BCR en células T y B1a respectivamente, b) en la supervivencia celular linfocitaria, c) en la tolerancia inmunológica, y d) en el reconocimiento de PAMPs asociados a hongos (y virus).

### 3.2.3. Impacto de CD5 en patología inmunomediada

Teniendo en cuenta el papel de CD5 en la modulación de la señal de reconocimiento Ag-específica mediada por TCR/BCR, en su función en el desarrollo y homeostasis de las distintas poblaciones linfocitarias y en la tolerancia inmunológica, no es de extrañar que este receptor haya sido motivo de estudio en distintas enfermedades inmunomediadas y en distintos ensayos con fines terapéuticos.

En la actualidad, disponemos de múltiples evidencias que implican a CD5 en enfermedades inmunomediadas tanto desde el punto de vista experimental, genético, así como terapéutico. El aumento de linfocitos B CD5+ ha sido asociado con diversas patologías inmunomediadas incluyendo la esclerosis múltiple (EM),<sup>221</sup> la AR,<sup>222</sup> LES,<sup>223,224</sup> la Tiroiditis de Grave-Basedow,<sup>225</sup> determinadas nefropatías o la Diabetes Mellitus (DM) tipo I.<sup>226</sup> Esta población B CD5+ es responsable de la producción de autoAc,<sup>227,228</sup> aunque nunca se ha demostrado una correlación directa entre los niveles de estas células con la gravedad de la enfermedad.<sup>229</sup> Por otro lado, la forma soluble de CD5 (sCD5) han sido asociada con el síndrome de Sjögren (SS)<sup>230</sup>, la Dermatitis Atópica<sup>231</sup> y el Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).<sup>232</sup>

En el modelo experimental murino de EM conocido como EAE, los ratones CD5<sup>-/-</sup> mostraban un retraso en la aparición de los síntomas y un fenotipo de enfermedad más leve<sup>213</sup> consecuencia de una mayor muerte celular por AICD debida a la hiperreactividad de las células patogénicas T CD4+ y a una menor infiltración del Sistema Nervioso Central (SNC).<sup>216</sup> Por otro lado, ratones transgénicos que expresan constitutivamente sCD5 humano (con efecto *decoy receptor*) desarrollan una forma más grave de EAE.<sup>233</sup> Estos datos aparentemente dispares son difíciles de interpretar pero podrían explicarse por diferencias con respecto al momento y a la pauta de administración así como por la mutua activación de sCD5 y el receptor CD5 unido a membrana.

### 3.2.4. Polimorfismos de CD5 en la enfermedad inmunomediada

El gen humano *CD5* presenta distintas variantes genéticas no sinónimas debidas a cambios de un único nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*). Entre ellas, destacan dos presentes en la raza caucásica en frecuencias relativamente altas: rs2241002 (C>T; P224>L) que presenta una sustitución Pro→Leu en la posición 224 del segundo dominio (D2) extracelular, y rs2229177 (C>T, A471>Val) una sustitución de Ala→Val en la posición 471 adyacente a un motivo citoplasmático pseudo-ITAM.<sup>234</sup> Los individuos con la variante Ala471 presentan respuestas linfoproliferativas T más intensas que los portadores de la variante Val471<sup>224</sup>. Ello podría explicar por qué este SNP ha sido motivo de selección reciente en la evolución de la especie humana, posiblemente por la presión de ciertos agentes ambientales no identificados.<sup>235</sup>

Hasta la fecha, existen pocos estudios que hayan asociado polimorfismos de *CD5* con enfermedades autoinmunitarias. *CD5* ha sido identificado como gen de susceptibilidad en la AR en un estudio de mapeo genético de alta densidad, identificándose como probables SNPs responsables a rs595158 y rs2229177.<sup>236</sup> Por otro lado, Cenit et al.<sup>224</sup> demostraron que los portadores del alelo de riesgo rs2241002<sup>C</sup> (Ala471) presentaban una hiperactividad en la respuesta de TCR y un mayor riesgo de desarrollar nefritis lúpica. Se ha postulado que ambas enfermedades aparecen cuando se pierde la tolerancia frente a las células apoptóticas. En este sentido, Miles et al.<sup>237</sup> demostraron la importante función de las células B1a en mantener la tolerancia frente a células apoptóticas mediante la secreción de Ac naturales polireactivos de baja afinidad e IL-10. Tanto los Ac polireactivos como IL-10 aceleran el aclaramiento de células apoptóticas por parte de los macrófagos evitando la aparición de fenómenos autoinmunitarios. Además, es conocido que múltiples genes asociados a enfermedad autoinmunitaria se comparten en los distintos procesos autoinmunitarios, por lo que podría considerarse a *CD5* como un nuevo factor de riesgo o modificador fenotípico de la enfermedad autoinmunitaria.<sup>238</sup>

### 3.2.5. Terapias inmunodirigidas y CD5 en patología inmunomediada y oncológica

CD5 ha sido usado como diana terapéutica en distintas patologías inmunológicas. Numerosos grupos de investigadores han descrito la experiencia del uso de anticuerpos monoclonales (AcMos) anti-CD5 conjugados a toxinas con el fin de inducir la depleción de las células CD5+ en distintas patologías como DM tipo 1,<sup>239</sup> LES<sup>240</sup> y AR.<sup>241</sup> Si bien los resultados preliminares parecían ser favorables, los efectos citotóxicos por depleción de células CD5+ y otras múltiples reacciones adversas desestimaron el uso de los AcMos anti-CD5.<sup>242</sup> Los primeros estudios que demostraron la utilidad de AcMos anti-CD5 en enfermedad inflamatoria se desarrollaron en modelos animales como la artritis inducida por colágeno (CIA) y la glomerulonefritis mesangial-proliferativa.<sup>243</sup> Sin embargo, el uso translacional de estos anticuerpos (Ac) en humanos mostró resultados insatisfactorios. En los primeros estudios pre-eliminarios en AR se observaron resultados alentadores; sin embargo, un posterior ensayo clínico con 104 participantes fracasó en demostrar su eficacia.<sup>244</sup> La terapia con AcMos anti-CD5 también fue también testada en un estudio con 6 pacientes afectados de LES en el que se observó mejoría de la nefritis en tan solo 2 de ellos.<sup>240</sup> Del mismo modo, estos anticuerpos también se utilizaron en la prevención del rechazo de trasplante de médula ósea, pero mostraron una baja efectividad y, en ocasiones, se asociaron al empeoramiento del estado de algunos pacientes.<sup>245,246</sup> Probablemente, la naturaleza quimérica de los AcMos utilizados, la potencia de los fármacos en la depleción de las células CD5+ y la multifuncionalidad de la diana terapéutica presente en células T y B1a tanto efectoras como reguladoras explica el fracaso de estos primeros ensayos terapéuticos en la enfermedad inmunomediada.

Las terapias anti-CD5 se han utilizado con mayor éxito en el campo de la oncología para potenciar la respuesta citotóxica de las células T sensibilizadas frente a antígenos tumorales. El bloqueo de CD5 favorece una mayor reactividad de estas células contra las células neoplásicas, y si bien presentan una mayor muerte celular por activación, esta intervención terapéutica conduce a una mayor regresión del tumor.<sup>183</sup> Otra estrategia es el uso de la forma soluble del receptor sCD5. De este modo, sCD5 se une a sus ligandos evitando la unión de éstos en el receptor transmembrana y así su función inhibitoria de CD5 (efecto *decoy receptor*). La mayor respuesta anti-tumoral de este intervención

terapéutica se atribuye a una menor actividad de las poblaciones Treg y Breg y a un aumento en el número de NKT.<sup>233</sup>

Un aspecto importante a tener en cuenta con la terapias relacionadas con CD5 es la dualidad de este receptor; si bien el bloqueo de CD5 se asocia a una mayor efecto antitumoral (suprime la inhibición de CD5 sobre el TCR de linfocitos respondedores frente a Ag tumorales), este mismo efecto puede favorecer la aparición de fenómenos autoinmunitarios permitiendo una mayor reactividad de células T sensibilizadas frente Ag propios.<sup>233</sup> Por el contrario, la estimulación de CD5 puede disminuir la reactividad inflamatoria y beneficiar al paciente con enfermedad inmunomediada, pero a su vez, disminuir la inmunovigilancia frente a células neoplásicas y favorecer la aparición de enfermedades neoplásicas. Además, hay que tener en cuenta que CD5 está presente tanto poblaciones de células T efectoras CD4+ y CD8+ como Tregs, por lo que las terapias anti-CD5 (no específicas para subpoblaciones linfocíticas) pueden presentar efectos inmunológicos dispares e incluso contradictorios. Quizá, la dualidad de este efecto motive el fracaso de las terapias anti-CD5 utilizadas hasta la fecha en la patología inmunomediada.

### 3.3. Receptor linfocítico CD6

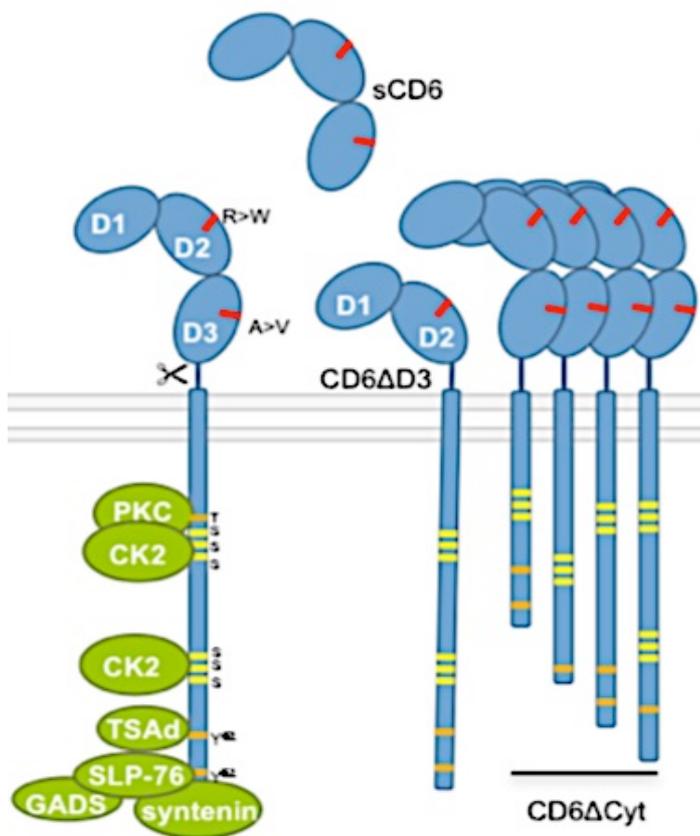
#### 3.3.1. Estructura, expresión y ligandos de CD6

Al igual que CD5, CD6 es un receptor monomérico constituido por una glicoproteína de membrana tipo I de 105-130 kDa perteneciente a la SF-SRCR. Consta de una región extracelular compuesta por 3 dominios SRCR tipo B (D1, D2 y D3), una región transmembrana y otra citoplasmática responsable de la transducción de señales intracelulares.<sup>196</sup> El gen *CD6* contiene 13 exones (6 para la región extracelular, 1 para la transmembrana y otros 6 para la citoplasmática) cuyo *splicing* alternativo puede dar lugar a distintas isoformas que afectan principalmente a su región citoplasmáticas pero también a su región extracelular, modificando así la integridad funcional del receptor.<sup>181,247</sup>

El dominio citoplasmático responsable de la transmisión del señal no tiene actividad catalítica propia pero presenta distintos motivos susceptibles de ser fosforilados; a) motivos Thr/Ser<sup>247</sup> constitutivamente fosforilados por CK2 y PKC, necesarios para la

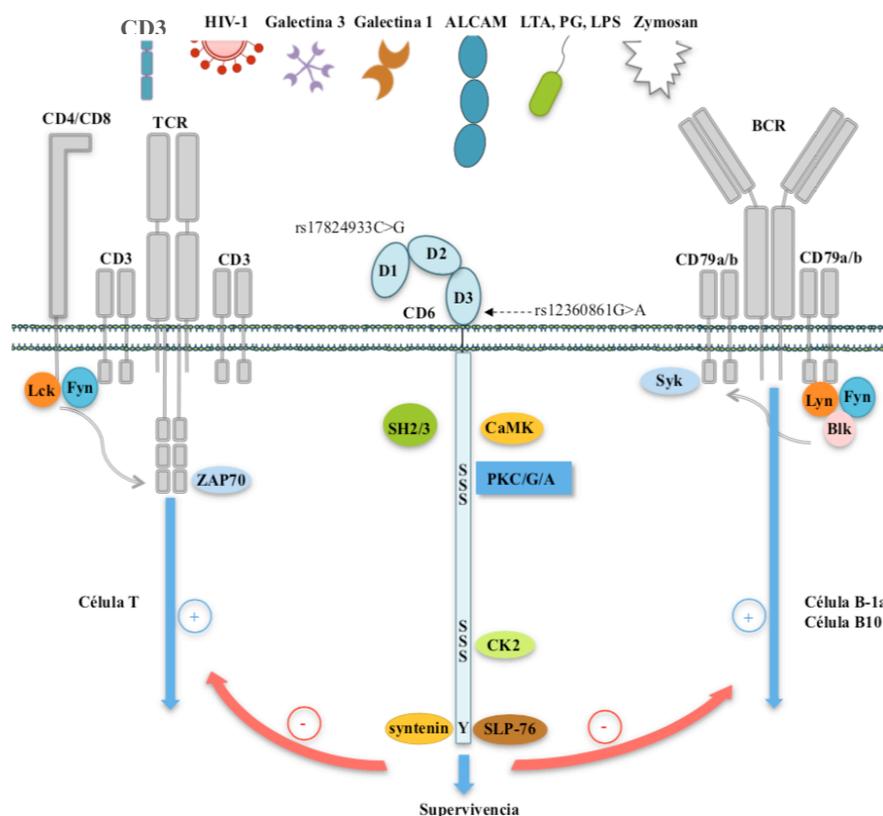
## INTRODUCCIÓN

activación de MAPK (*mitogen-activated protein kinases*),<sup>248</sup> y b) residuos Tyr<sup>249</sup> que son fosforilados tras la activación de TCR por Lck o ZAP-70 y que sirven de anclaje para otras proteínas transductoras con dominios SH3 y SH2 como TSAd, GADS, syntenin-1 y SLP-76 (ver **figuras 14 y 15**).<sup>250-252</sup> Además, la activación de CD6 y TCR induce la entrada masiva de Ca<sup>2+</sup> que a su vez podría regular algunos miembros de la familia de tirosininasas (PTK). No obstante, la vía de transducción intracelular de CD6 está aún por caracterizar completamente.



**Figura 14.** Isoformas del receptor linfocítico CD6. A la izquierda se muestra la isoforma completa del receptor. En el centro, la isoforma CD6ΔD3 desprovista del D3 por lo que no puede unirse a CD166/ALCAM. A la derecha, múltiples isoformas con cambios en su cola citoplasmática. Libre, la forma soluble del receptor que carece de región transmembrana y citoplasmática (sCD6); producto de la escisión del receptor tras su activación, y representa un mecanismo de regulación que evita su hiperactividad. En verde, las distintas proteínas accesorias con capacidad catalítica. Adaptada de *Consuegra-Fernández M et al, Autoimmun Rev 2018*.<sup>253</sup>

CD6 se expresa en células T y en una subpoblación de células B (B1a) y NK, así como en algunos precursores hematopoyéticos y determinadas células cerebrales.<sup>179</sup> Los timocitos expresan CD6 con intensidad creciente a lo largo de todas las etapas de su desarrollo y su expresión se correlaciona directamente con la resistencia a la apoptosis. En sangre periférica, las células T CD4<sup>+</sup> expresan más intensamente CD6 que las células T CD8<sup>+</sup>. Por otro lado, las células Treg y las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activadas o memoria efectoras (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) expresan niveles bajos de CD6 respecto a las células T naïve o de memoria central (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>).<sup>254</sup>



**Figura 15.** Representación esquemática de las interacciones extracelular e intracelulares mediadas por CD6. Las moléculas transductoras de señales intracelulares que se asocian a CD6 aparecen junto a los residuos fosforilables Tyr (Y) y Thr (T)/ Ser (S) con los que interaccionan. Tomada de *Sarukhan A et al, Curr Drug Targets. 2016.*<sup>255</sup>

CD6 sí presenta un ligando bien conocido, CD166/ALCAM (*Activated Leukocyte Cell Adhesión Molecule*), una molécula de adhesión perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas y ampliamente expresada en células del endotelio, en la piel y en distintos epitelios (incluyendo el del timo, tubo digestivo, páncreas, hígado, riñón, córtex cerebral), en el tejido linfático, la médula ósea, el bazo y en células inmunitarias incluyendo células T activadas y células presentadoras de antígeno (APC) como las DCs, los macrófagos y las células B.<sup>256</sup> CD166/ALCAM y CD6 participan en contactos célula-célula, en los procesos de migración celular y en la transmisión de señales entre células.<sup>179</sup> La unión heterofílica entre estos dos receptores se establece entre el D3 de CD6 (el más próximo a membrana) y el dominio N-terminal (V1) de CD166/ALCAM en una estequiometría 1:1 y con una afinidad entre 10 y 100 mayor que la afeidez entre la unión homofílica CD166/ALCAM-CD166/ALCAM.<sup>257</sup> Otro ligando recientemente descrito de

## INTRODUCCIÓN

CD6 es CD318/CDCP-1 (*CUB-domain containing protein 1*). Se trata de un receptor de membrana expresado en los queratinocitos activados por INF- $\gamma$  y en los fibroblastos de la membrana sinovial, entre otras células epiteliales y mesenquimales, si bien su función en la regulación de las respuestas inmunitarias aún no ha sido estudiada.<sup>258</sup>

Como PRR, CD6 también puede unirse a determinados patrones moleculares asociados a patógenos o daño tisular (PAMPs y DAMPs, respectivamente). Concretamente, CD6 se une con gran avidez a PAMPs presentes tanto en bacterias Gram+ (peptidoglicanos (PGN) y ácido lipoteico (LTA)) como en bacterias Gram- (LPS).<sup>259,260</sup> De este modo, CD6 parece complementarse con su receptor “hermano” CD5 ampliando el abanico de PAMPs capaces de identificar; mientras que CD5 es capaz de identificar estructuras fúngicas, CD6 ha evolucionado para poder reconocer estructuras bacterianas.<sup>178</sup> Además, CD6 también interactúa con el *loop* V3 de gp120, la principal glicoproteína del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) implicada en la penetración en las células CD4+.<sup>253</sup> En cuanto a DAMPs se refiere, CD6 es capaz de unirse a Galectina-1 y -3, expresada en células inflamatorias y no-inflamatorias e implicadas en procesos celulares como la adhesión, la migración, la diferenciación, la proliferación y la muerte celular. Es de destacar que Galectina-1 y -3 al unirse a CD6 interfieren en la activación por superantígenos y en la adhesión mediada por CD6-CD166/ALCAM, y que la expresión de CD6 protege a las células de la apoptosis inducida por Galectina-1 y -3.<sup>261</sup>

### 3.3.2. Funciones inmunológicas de CD6

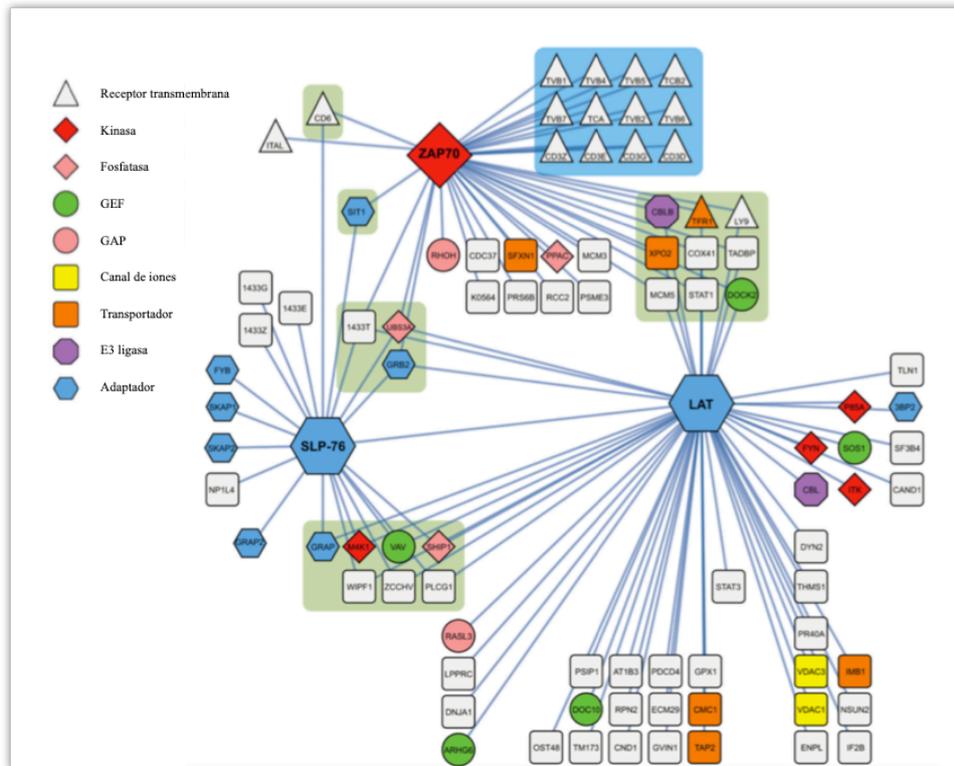
Como se ha comentado anteriormente, CD6 actúa como receptor de adhesión y de transducción del señal intracelular gracias a su ligando CD166/ALCAM y probablemente también a CD318 y Galectinas 1 y 3. En primer lugar, CD6 participa en la formación y estabilización de las uniones entre las células T/B1a y las APCs,<sup>262-264</sup> pero también pueden participar otros tipos celulares CD166/ALCAM+ como células epiteliales, endoteliales, fibroblastos u osteoblastos.<sup>265,266</sup> En segundo lugar, durante estas uniones, las señales derivadas de CD6 modulan la señal principal generada por TCR/BCR tras el reconocimiento de péptidos presentados en moléculas MHC tipo I o II.

### 3.3.2.1. *CD6 en la interacción célula-célula y su participación en la sinapsis inmunológica*

Varios estudios han demostrado el papel fundamental de la interacción CD6-CD166/ALCAM en el contacto célula T-APC.<sup>262</sup> La interacción entre CD6-CD166/ALCAM estabiliza la unión entre las células T y las distintas APCs y da el tiempo suficiente para que se establezca una correcta sinapsis inmunológica.<sup>264</sup> La alteración de la unión CD6-CD166/ALCAM podría condicionar una deficiente señal mediada por TCR y en consecuencia una menor proliferación tras la estimulación alogénica de las células T.<sup>179</sup>

Más importante si cabe, CD6 funciona como co-receptor linfocítico y es capaz de modular la señal principal mediada por TCR/CD3 gracias a su función como receptor transductor de señales y a su íntima relación física con TCR.<sup>267</sup> Como se ha mencionado anteriormente la cola citoplasmática de CD6 posee múltiples residuos Ser/Thr/Tyr fosforilables de forma constitutiva o inducible tras la activación de TCR<sup>249</sup> que sirven de punto de anclaje de otras proteínas transductoras de señales.<sup>250-252,263,267,268</sup> De este modo, CD6 actúa como un centro de señalización adicional y/o alternativo a LAT (*Linker of activation of T cells*) y modifica y diversifica la señal mediada por TCR/CD3 en las células T (**figura 16**).<sup>268</sup>

Los primeros estudios *in vitro* y otros más recientes sugirieron que CD6 actuaba como una molécula co-estimuladora<sup>248,262,263,269-271</sup> La primera evidencia en contra del papel co-estimulador de CD6 se observó en un estudio que demostró que la sobreexpresión de CD6 minimizaba las señales iniciales (movilización de Ca<sup>2+</sup>) y las tardías (producción de IL-2) en las células T activadas.<sup>272</sup> Posteriormente, los estudios experimentales con ratones CD6<sup>-/-</sup> han posicionado a CD6 como un regulador negativo ya que aumenta el umbral de activación de la respuesta mediada por TCR.<sup>184,190,272</sup> De hecho, tras la estimulación de TCR, la ausencia de CD6 convierte a timocitos inmaduros y células periféricas T en hiperreactivos y más proclives a la muerte por AICD.<sup>184,190,254</sup> El mecanismo molecular por el que CD6 actuaría como freno de la respuesta TCR es desconocido pero se especula que podría estar implicado CD5. Probablemente, la complejidad de este receptor con un gran potencial de transducción del señal intracelular y localizado en un lugar privilegiado en la SI le otorga un carácter dual con funciones estimuladoras y otras inhibitorias dependientes del contexto inmunológico y el tipo de célula T estimulada.



**Figura 16.** CD6 como receptor transductor y modulador de la señal mediada por TCR/BCR. Tras la activación de TCR, Zap70 fosforila los residuos Tyr de CD6 permitiendo así el acoplamiento de SLP-76. Esta proteína adaptadora activará distintas cascadas enzimáticas para la diversificación del señal intracelular. Tomada de *Roncagalli R et al, Nature Immunol 2014*.<sup>268</sup>

Por otro lado,<sup>262,264</sup> CD6 como molécula de adhesión participa también en el tráfico celular a través del endotelio a distintos tejidos lesionados como el cerebro en la EAE,<sup>273</sup> el tejido sinovial en la artritis<sup>274</sup> o la piel, gracias ligandos como CD166/ALCAM<sup>265</sup> y posiblemente también CD318 y Galectina-1 y -3.

### 3.3.2.2. *CD6 en la selección y maduración de la célula T en el timo y en la hemostasis de la células T periféricas*

CD6 está implicado en la selección y maduración de las células T en el timo mediante la modulación del umbral de activación de TCR y la supervivencia celular.<sup>267,275</sup> Estudios con ratones CD6<sup>-/-</sup> muestran una menor producción de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tímicas por una mayor selección negativa consecuencia de un menor umbral de activación de TCR.<sup>184</sup> Por otro lado, este receptor también está implicado en la hemostasis de las distintas subpoblaciones T en la periferia incluyendo células T efectoras y reguladoras. El déficit de

CD6 provoca una menor polarización celular Th1 y Th17<sup>184,190</sup> pero una mayor inducción de células T memoria y reguladoras.<sup>179,190</sup> Este fenómeno junto con un menor tráfico e infiltración celular en los tejidos diana (por una hipotética función deficitaria atribuida también a CD6), son la base del tratamiento anti-CD6 en patología autoinmunitaria.

### **3.3.2.3. CD6 como receptor reconecedor de patrones moleculares**

Al igual que CD5, CD6 también es capaz de reconocer y unirse a PAMPs en este caso asociados a bacterias tanto Gram+ (LTA y PGN) como Gram- (LPS). Estas toxinas provocan la secreción de grandes cantidades de citocinas en el huésped humano responsables de una gran reacción inflamatoria y eventualmente de disfunción multiorgánica y shock séptico.<sup>276</sup> De este modo, el uso terapéutico de una forma soluble del receptor CD6 capaz de unirse a LPS y LTA, bloquea dichas partículas bacterianas y, evita la liberación de importantes cantidades de citocinas que eventualmente podrían conducir al shock séptico.<sup>260</sup> Teniendo en cuenta el papel inhibitorio de CD6 y CD5, y su función como receptores centinelas capaces de detectar la presencia de estructuras bacterianas y fúngicas, se postula que estos receptores podrían ayudar a a) favorecer solo la activación de las células con alta afinidad y permitir una respuesta anti-bacteriana eficaz y, b) evitar la estimulación de las células con baja afinidad y la aparición de fenómenos autoinmunitarios.<sup>277</sup>

### **3.3.2.4. CD6 en las células B**

La función de CD6 en las células B ha sido poco estudiada. Los estudios disponibles muestran que CD6 se expresa selectivamente en células B1a del bazo, hígado neonatal o sangre periférica, pero no en la médula ósea ni cavidades peritoneales. Los ratones CD6<sup>-/-</sup> muestran niveles inferiores de anticuerpos naturales poli-reactivos de tipo IgM junto con disminución de la subpoblación B1a, hecho que sugiere que CD6 está implicado en la homeostasis de esta subpoblación linfocítica.<sup>278</sup>

## INTRODUCCIÓN

En definitiva, CD6 es un receptor implicado en la adhesión célula-célula y la modulación de la respuesta inmunitaria adaptativa con una función multifacética relevante en:

- 1) la selección y maduración de las células T en el timo,
- 2) la migración de células T,
- 3) la regulación en la activación y proliferación de las células T y B1a periféricas,
- 4) la maduración de células Treg funcionalmente activas, y
- 5) el reconocimiento y respuesta inflamatoria de PAMPs bacterianos.

### **3.3.3. CD6 en las enfermedades inmunomediadas**

Si bien el abordaje del estudio de CD6 se ha desarrollado con posterioridad al de CD5, existen actualmente evidencias más sólidas de su implicación en enfermedades inmunomediadas que le otorgan una posición muy atractiva como diana terapéutica. Como receptor accesorio capaz de modular respuesta principal mediada por TCR/BCR e influir en la activación, diferenciación y supervivencia celular de la célula estimulada, es fácil comprender que CD6 pueda estar implicado en la fisiopatología de las enfermedades inmunomediadas y que, incluso, sea susceptible de ser interceptada con fines terapéuticos.

### **3.3.4. Evidencia experimental de CD6 en patología inmunomediada**

CD6 ha sido relacionada con la EM, la AR y el LES, y ha sido objeto de estudios en los modelos animales pertinentes. La EM es una enfermedad neurológica mediada por células T autoreactivas. Además, CD166/ALCAM que media el tráfico leucocitario se expresa de manera preferente en la barrera hemato-encefálica de pacientes con EM activa y en el modelo experimental murino EAE.<sup>273</sup> Utilizando dicho modelo en ratones CD6<sup>-/-</sup>, Li et al.<sup>190</sup> observaron una respuesta inmunitaria celular reducida, una menor infiltración de la médula espinal por células T y una menor gravedad de la enfermedad. La ausencia de CD6 se asoció a una mayor activación de células T pero a su vez, a una menor supervivencia y proliferación y, en consecuencia, a una menor polarización Th1 y Th17 responsable de la enfermedad. Las células T CD6<sup>-/-</sup> mostraron también una menor capacidad transmigratoria por el endotelio cerebral. Además, los mismos autores, demostraron que con el uso de un AcMo anti-CD6 el fenotipo patológico en el modelo de EAE mejoraba drásticamente.<sup>190</sup>

CD6 ha sido relacionado con la AR por su función como molécula de adhesión en la migración celular. Las células sinoviales expresan tanto CD166/ALCAM como CD318 (y Galectinas 1 y 3), todos ligandos de CD6, y estas interacciones han demostrado mediar la adhesión entre las células T y los fibroblastos de la sinovial del tejido articular y del hueso.<sup>265,279</sup> Sin embargo, la influencia de CD6 en otros modelos experimentales ha mostrado resultados inesperados. En el modelo experimental de AR denominado CIA (*Collagen-Induced Arthritis*), los ratones CD6<sup>-/-</sup> mostraron una mayor incidencia, precocidad y gravedad de la enfermedad en comparación con los controles. Ello se asociaba a una mayor expresión de TNF e IL-6 en las articulaciones y una menor expresión de marcadores Treg como FoxP3. Estos resultados son congruentes con el hecho que un déficit en CD6 favorecería la inducción de una respuesta autoinmunitaria Th17 frente al colágeno en el contexto de una menor actividad supresora Treg.<sup>184</sup>

En cuanto al estudio al estudio de CD6 en un modelo de lupus-*like* inducido por enfermedad crónica de injerto contra huésped (cGvHD), los ratones CD6<sup>-/-</sup> mostraron niveles más elevados de auto-Ac (anti-dsDNA y anti-nucleosoma) y serositis propios de la enfermedad en comparación con los ratones control. Estos ratones también mostraban una mayor inducción de células Treg pero con menor capacidad supresora, hecho que podría explicar la mayor producción de auto-Ac.<sup>179</sup>

La relación entre CD6 y psoriasis surgió en 1999 cuando en base a un estudio previo en pacientes con linfoma cutáneo de células T, Montero et al.<sup>280</sup> administraron por primera vez un AcMo anti-CD6 en un paciente con psoriasis. Dado que las evidencias entre CD6 y psoriasis se basan en la experiencia con el uso de fármacos biológicos anti-CD6, se discutirá en el correspondiente apartado *Terapias inmunodirigidas y CD6 en enfermedad inmunomediada*.

En resumen, los modelos experimentales EAE por un lado y de CIA y lupus-*like*/cGvHD por otro, muestran resultados dispares en cuanto a la influencia de CD6, posiblemente reflejo de la complejidad funcional de este receptor. Sin embargo, en todos ellos, CD6 parece desarrollar un papel relevante.

### 3.3.5. Polimorfismo de CD6 en patología inmunomediada

En los últimos años se han identificado hasta 14 polimorfismos en el gen CD6, tres de ellos asociados a mayor susceptibilidad para desarrollar EM.<sup>281,282</sup> En concreto, se trata de 3 SNPs localizados en el intron 1 (rs17824933, A>G), los exones 4 (rs11230563, R225>W) y 5 (rs2074225, A257>V). Sin embargo, aún no se ha descifrado completamente su impacto sobre la estructura y función de CD6 y su relación con el desarrollo de la enfermedad. Sí se ha demostrado que los individuos homocigotos rs17824933<sup>GG</sup> si bien muestran una expresión de CD6 similar a los individuos rs17824933<sup>CC</sup>, presentan una mayor expresión relativa de la isoforma CD6ΔD3 desprovista del dominio que media la interacción con CD166/ALCAM.<sup>281</sup> Las células T de estos individuos presentan una menor proliferación y una menor infiltración de Tregs en el SNC que podría impedir su función reguladora y facilitar la aparición de fenómenos autoinmunitarios. En cuanto al segundo SNP, rs11230563<sup>c</sup> forma junto con rs2074225<sup>c</sup> (localizado en D2) un haplotipo asociado a una mayor expresión del receptor en células CD4+, CD8+ y NK.<sup>282</sup> Esta mayor expresión de CD6 se ha correlacionado con un mayor número de lesiones activas en el estudio con RMN con gadolinium.<sup>283</sup> Además, esta mayor expresión de CD6 también se ha detectado en las células Th17 que orquestan la inflamación autoinmune en la EM.<sup>284</sup> Por lo que respecta al tercer SNP, la homocigosis para rs12360861<sup>AA</sup>, reduce hasta x3 el riesgo de desarrollar la enfermedad respecto a los individuos rs12360861<sup>GG</sup>.<sup>285</sup> La sustitución de G por A en D3 afectaría la interacción de CD6 con CD166/ALCAM. De hecho, se postula que este cambio favorece la expresión de la isoforma CD6ΔD3 (como ocurre con rs17824933). Paradójicamente, en este caso, el SNP que favorece la expresión de la isoforma CD6ΔD3 es la que ofrece protección frente a EM. Los autores sugieren que un déficit en la interacción CD6-CD166/ALCAM interferiría con la trans migración de las células CD4+ patogénicas al SNC.<sup>273</sup> Sin embargo, el papel de CD6 en la EM podría no estar en relación con su interacción CD166/ALCAM (ver más adelante).

Existen pocos estudios sobre los polimorfismos de CD6 en otras enfermedades distintas a la EM. Cabe citar que en un estudio en el que se incluyeron 1149 enfermos y 2107 controles de una población Han china, los autores identificaron el SNP rs11230563 de *CD6* como factor genético de susceptibilidad para la Enfermedad de Beçhet (EB).<sup>286</sup> Hasta la fecha, este resultado no ha sido replicado ni validado en otros estudios, y no existen otras

evidencias que relacionen CD6 con la enfermedad. Por otro lado, un estudio GWAS con pacientes con EII identificó a rs112305563 como factor genético de susceptibilidad a la enfermedad.<sup>287</sup> Sin embargo, la relación entre este SNP y la enfermedad aún está por esclarecer. De hecho, no existen otras evidencias que relacionen la EII con CD6 y cabe recordar que las células T de la lámina propia y del epitelio digestivo tanto de individuos sanos como de pacientes no expresan CD6 (ni tampoco CD5).<sup>288</sup>

### 3.3.6. Terapias inmunodirigidas y CD6 en patología inmunomediada

El tratamiento inmunodirigido en enfermedades inmunomediadas en relación a CD6 ha tenido mayor éxito con respecto a su receptor hermano CD5. Ya en los años 80, se utilizaron los primeros AcMos anti-CD6 humanos (denominados anti-T12) como tratamiento inmunosupresor en la prevención del rechazo en el trasplante de riñón y médula ósea dado su efecto deplectivo en las células T.<sup>289,290</sup> Con el uso de estos primeros AcMos aparecieron los primeros estudios sobre el funcionamiento de estos fármacos y los efectos de su unión con el receptor.<sup>270,271</sup>

Sorprendentemente, a finales de los 90, y sin otras evidencias experimentales o genéticas disponibles en ese momento, un AcMo anti-CD6 IgG<sub>2a</sub> murino denominado IOR-T1 fue administrado a un paciente con Psoriasis por el equipo del Dr. Pérez.<sup>280</sup> El tratamiento consiguió blanquear las placas de psoriasis sin depleccionar la población de células T ni ocasionar importantes efectos adversos. A raíz de este primer ensayo, y en aras de disminuir su inmunogenicidad para poder ser administrado de forma segura en largos periodos de tiempo, el AcMo se humanizó resultando la molécula que actualmente conocemos como T1h/Itolizumab.<sup>291</sup> Este fármaco ha sido testado en distintos ensayos clínicos fase II y III realizados en India y Cuba en pacientes con Psoriasis moderada-grave con resultados satisfactorios<sup>192</sup>. Ello ha permitido en última instancia la aprobación del fármaco para la Psoriasis moderada-grave por la *Drugs Controller General of India* y también en Cuba.<sup>292,293</sup>

Itolizumab es un AcMo humanizado IgG<sub>1</sub> dirigido contra el D1 de CD6 (CD6.D1).<sup>191</sup> Su eficacia en el tratamiento de la psoriasis moderada-grave, ha sido contrastada en distintos

## INTRODUCCIÓN

ensayo clínicos alcanzando respuestas PASI75 hasta en el 40% de los pacientes.<sup>192</sup> Esta respuesta es prolongada e incluso propicia largos periodos libres de enfermedad tras la suspensión del tratamiento. Además, Itolizumab también ha demostrado ser eficaz en pacientes tratados en práctica clínica habitual<sup>294</sup> y en pacientes con distintas comorbilidades.<sup>295</sup> En todos los ensayos clínicos y series de pacientes reportadas, Itolizumab ha mostrado un perfil de seguridad favorable.<sup>191</sup> Sin embargo, es necesario la realización de nuevos ensayos clínicos de mayor envergadura y grupo comparativo activo (especialmente con los fármacos sistémicos y las terapias biológicas actualmente disponibles) para definir el posicionamiento del fármaco en el amplio arsenal terapéutico de la Psoriasis.<sup>191</sup>

El mecanismo por el que Itolizumab es eficaz en Psoriasis engloba una inhibición de la activación y proliferación de las células T, una menor producción de citocinas pro-inflamatorias (INF- $\gamma$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y una menor expresión de moléculas de adhesión que impediría así el tráfico de las células inflamatorias a la piel. Todo ello conduce a una menor hiperplasia epidérmica, una reducción de la inflamación y la resolución de la placa psoriasisica.<sup>296</sup> En cuanto a seguridad, se argumenta que el hecho que Itolizumab no provoque la depleción de células T representa un rasgo relevante que determina el buen perfil de seguridad del fármaco minimizando la aparición de efectos secundarios como las infecciones víricas y bacterianas.<sup>297</sup>

Pese a que Itolizumab no interfiere la interacción entre CD6 y CD166/ALCAM, sí es capaz de bloquear la transducción del señal mediada por CD6 en la SI y regular las vías de activación de las célula T reduciendo la fosforilación de proteínas transductoras como MAPK, Akt y STAT-3.<sup>269</sup> Ello conduce a una menor activación y polarización de células Th17 (y Th1) que promueven la aparición de la Psoriasis.<sup>269,298</sup> Este bloqueo de la función de CD6 bien podría darse tanto por la incapacitación del receptor a transmitir la señal como por la inhibición en la formación de nuevos receptores o la depleción del receptor en superficie de membrana.<sup>299</sup>

Además, Itolizumab no solo reduce la expresión de citocinas pro-inflamatorias sino que es capaz de aumentar los niveles de IL-4 que a su vez reduce aún más la producción de INF- $\gamma$ .<sup>296</sup>

Itolizumab también ha sido testado en la AR. Ya en el 2012 se realizó un primer ensayo clínico fase I en el que se incluyó a 15 pacientes con AR.<sup>300</sup> Posteriormente, el mismo grupo demostró la eficacia de este fármaco en combinación con metotrexate (MTX) en la AR y otras enfermedades autoinmunitarias.<sup>293</sup> Ya en 2018, un nuevo ensayo fase I con fase abierta en el que se incluyeron un mayor número de pacientes tratados durante 24 semanas demostró de nuevo la eficacia y seguridad del AcMo en la AR.<sup>193</sup> Otro ensayo clínico fase II en el que se incluyeron 70 pacientes con AR refractarios al tratamiento con MTX, la adición de Itolizumab en su régimen terapéutico demostró ser eficaz.<sup>194</sup> El estudio de 30 pacientes de este ensayo clínico mostró que Itolizumab inducía una reducción de células T y una menor producción de citocinas pro-inflamatorias incluyendo INF- $\gamma$  IL-6 y TNF- $\alpha$ .<sup>301</sup>

La terapia inmunodirigida anti-CD6 también se ha probado en modelos experimentales de EM. La administración de dos AcMos anti-CD6.D1 en 2 modelos de EAE demostró ser eficaz en la reducción de la severidad de la enfermedad. El hecho que estos dos AcMos no interfieren en la interacción entre CD6 y CD166/ALCAM sugiere la existencia de otro ligando de CD6.D1 como favorecedor de la enfermedad. Teniendo en cuenta la identificación de CD318 como un nuevo ligando de CD6, y que ratones CD318<sup>-/-</sup> muestran fenotipos menos severos de EAE,<sup>190</sup> la interacción CD6-CD318 representa nuevo mecanismo a explorar en la fisiopatogenia de la EM.<sup>258</sup> Otra explicación alternativa es que, al igual que en Psoriasis, estos fármacos podrían regular la señal de CD6 sin bloquear su unión con CD166/ACAM e inhibir activación de células patogénicas Th1 y Th17.

En conclusión, Itolizumab se muestra como un fármaco biológico que, como otros de sus homólogos, es de utilidad en distintas enfermedades inmunomediadas como Psoriasis, AR y EM que comparten elementos patogénicos comunes, y pone de manifiesto el importante papel de CD6 en la inflamación y la autoinmunidad propia de estas enfermedades crónicas.

## INTRODUCCIÓN

Dada la eficacia de Itolizumab en Psoriasis, y el papel fisiopatogénico de CD6 en la homeostasia de las distintas poblaciones de células T y su capacidad de modular la respuesta mediada por TCR, nuestro grupo de investigación seleccionó este receptor junto a CD5 y CD166/ALCAM para estudiar su influencia en la enfermedad y aportar nuevas evidencias sobre su papel en la inmunopatogenia de la Psoriasis.

## 4. Receptores Fc $\gamma$ y tratamiento biológico anti-TNF- $\alpha$ en Psoriasis

### 4.1. Introducción

Los receptores Fc-gamma (Fc $\gamma$ Rs) constituyen uno de los ejes centrales del SI y son responsables de la mediación de las respuestas desencadenadas por anticuerpos (Acs) IgG. Su ligando es el fragmento constante o cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas G (IgG) y junto con los receptores Fc-neonatal (FcRn), Fc-alfa (Fc $\alpha$ R) y Fc-epsilon (Fc $\epsilon$ R) forman parte de la superfamilia de receptores con dominios tipo inmunoglobulina. Los Fc $\gamma$ Rs se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema hematopoyético, tanto en células mieloides (monocitos, macrófagos, DCs, mastocitos, neutrófilos y basófilos) como no-mieloides incluyendo células B, células plasmáticas y células NK. Estos receptores permiten la interacción entre los ICs formados por Acs IgG y su antígeno con células efectoras del SI innato como macrófagos o células NK encargadas de fagocitar, destruir o eliminar dichos ICs.<sup>302</sup> Además, los Fc $\gamma$ Rs intervienen en la presentación del antígeno, la maduración de las DCs, la activación de las células B y la supervivencia de las células plasmáticas por lo que intervienen tanto en la respuesta inmunitaria adaptativa mediada por células T como en la producción de Acs mediada por células B.<sup>303</sup> De este modo, los Fc $\gamma$ Rs desarrollan un papel crucial tanto en el SI innato como adaptativo y constituyen un puente de unión entre ellos.

Los Fc $\gamma$ Rs fueron identificados en los años 60, pero no fue hasta finales de los años 90 en que su trascendental función en el SI fue reconocida.<sup>304</sup> Actualmente los Fc $\gamma$ Rs son aceptados como responsables de la fase efectora celular desencadenada por el reconocimiento de antígenos mediado por IgG, que incluye la inflamación inducida por ICs, la fagocitosis, la liberación de citocinas, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la ADCC.<sup>302</sup>

Además, los Fc $\gamma$ Rs constituyen un sistema de control de la tolerancia inmunológica y de la génesis de Acs ya que intervienen en la regulación de la maduración de las DCs influyendo en la respuesta adaptativa, y en la regulación de la activación de las células B y la supervivencia de las células plasmáticas.<sup>302</sup> Así, los Fc $\gamma$ Rs tienen un papel tanto en el polo eferente del SI (funciones desencadenadas por IgG) como en el polo aferente, es decir, la

## INTRODUCCIÓN

propia producción de los Acs.

Los Fc $\gamma$ Rs han sido objeto de importantes investigaciones y han sido asociados tanto a patología autoinmunitaria como a una mayor susceptibilidad de padecer enfermedades infecciosas. La mayoría de los Fc $\gamma$ Rs presentan polimorfismos genéticos con relevancia funcional que afectan al grado de afinidad del receptor por la IgG y, en consecuencia, a la intensidad de las funciones resultantes de dicha interacción. Algunos de estos polimorfismos han sido relacionadas con LES,<sup>305,306</sup> AR,<sup>307</sup> Síndrome antifosfolipídico<sup>308</sup> o con la susceptibilidad a enfermedades infecciosas como Meningococemia grave<sup>309</sup>, Malaria<sup>310</sup> o Enfermedad periodontal.<sup>311</sup>

Por otro lado, los polimorfismos genéticos de Fc $\gamma$ Rs también han sido estudiados como posibles factores predictores en la respuesta al tratamiento con fármacos biológicos (continentes de la Fc de la IgG en su estructura molecular) en distintos procesos neoplásicos como en linfoma,<sup>312</sup> cáncer de mama<sup>313</sup> o cáncer colorectal<sup>314</sup> y, posteriormente, en la respuesta al tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$  de las enfermedades inflamatorias, principalmente AR y EC.<sup>315,316</sup> Este aspecto inmunofarmacogenético fue el que inspiró el cuarto de los proyectos presentados en esta Tesis Doctoral.

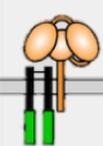
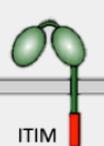
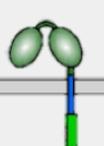
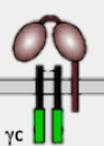
### 4.2. Familia de los Fc $\gamma$ Rs

La familia Fc $\gamma$ Rs en el ser humano está constituida por Fc $\gamma$ RI/CD64, Fc $\gamma$ RIIA/CD32A, Fc $\gamma$ RIIB/CD32B, Fc $\gamma$ RIIC/CD32C, Fc $\gamma$ RIIIA/CD16A y Fc $\gamma$ RIIIB/CD16B. Estos receptores, codificados por genes agrupados en el brazo largo del cromosoma 1, se diferencian entre ellos en dos aspectos fundamentales: a) su grado de afinidad por la IgG, y b) el tipo de vía de señalización capaces de desencadenar (activadora o inhibidora). De este modo, tenemos Fc $\gamma$ Rs de ‘alta afinidad’ (Fc $\gamma$ RI) y ‘baja afinidad’ (el resto), así como Fc $\gamma$ Rs inhibidores (Fc $\gamma$ RIIB) y activadores (todos los demás). El factor que determina la naturaleza activadora o inhibidora de un determinado Fc $\gamma$ R es la presencia de motivos activadores o inhibidores basados en tirosina (ITAM e ITIM, respectivamente) en su región citoplasmática.<sup>302</sup>

### 4.3. Estructura molecular de los FcγRs

Los FcγRs, a excepción de FcγRIIIB, son glicoproteínas transmembrana tipo 1. Sus ectodominios (cadenas α) consisten en 2 dominios (D1 y D2, en el caso de FcγRII, FcγRIII) o 3 dominios (D1, D2 y D3 en FcγRI) tipo inmunoglobulina.<sup>302</sup> La mayor afinidad de FcγRI/CD64 podría venir determinada por la presencia de un dominio extracelular adicional. Las cadenas α de los FcγRs, a excepción de FcγRIIIB, atraviesan la membrana plasmática y se introducen en el citoplasma (**Figura 17**).

El fragmento Fc de la IgG está formado por los dos dominios constantes de sus cadenas pesadas (C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>) que están unidos por una región bisagra. La unión entre el fragmento Fc y su receptor se establece entre un dominio C<sub>H2</sub> y un dominio extracelular de un único FcγR, estableciendo una estequiometría 1:1 para la interacción IgG-FcγR.<sup>317</sup> Por tanto, para que se produzca una unión cruzada o *crosslinking* de varios FcγRs y su posterior activación es necesaria la presencia de múltiples Fc formando parte de grandes ICs.<sup>302</sup>

Nombre	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIB	FcγRIIC	FcγRIIIA	FcγRIIIB	FcRn
CD	CD64	CD32A	CD32B	CD32C	CD16A	CD16B	-
Gen	FCGR1	FCGR2A	FCGR2B	FGR2C	FCGR3A	FCGR3B	FCGRT
							
Alelos	-	H <sub>131</sub> R <sub>131</sub>	-	-	V <sub>158</sub> F <sub>158</sub>	-	-
Afinidad							
IgG1	6x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>6</sup> 3x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup> 1x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>	8x10 <sup>7</sup>
IgG2	-	4x10 <sup>5</sup> 1x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>4</sup>	7x10 <sup>4</sup> 3x10 <sup>4</sup>	-	5x10 <sup>7</sup>
IgG3	6x10 <sup>7</sup>	9x10 <sup>5</sup> 9x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>7</sup> 8x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>7</sup>
IgG4	3x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>5</sup> 2x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup> 2x10 <sup>5</sup>	-	2x10 <sup>7</sup>
Principal función	Activación	Activación	Inhibición	Activación	Activación	Activación	Activación
Expresión	M, DC, N, Eo	M, DC, N, plaquetas	LB, CP, M, DC, N, Ba, mastocito	NK	NK, M, DC	N, Eo, mastocito	

**Figura 17** Familia de los receptores Fcγ en el ser humano: estructura esquemática, alelos, afinidad según serotipo IgG, función y expresión en las distintas células de sistema inmunitario. Abreviaturas: ITAM: motivos activadores basados en tirosina, ITIM: motivos inhibidores basados en tirosina, GPI = M: macrófago, DC: célula dendrítica, N: neutrófilo, Eo: eosinófilo, LB: linfocito B, Ba: basófilo, NK: natural killer. Adaptada de Bruhns P and Jönsson F, *Immunol Rev* 2015.<sup>318</sup>

## INTRODUCCIÓN

Todos los FcγRs excepto FcγRIIB/CD32B son considerados receptores activadores. La señal de activación se genera en los motivos ITAM albergados bien en la propia cadena α del receptor (en el caso de FcγRIIA/CD32A y FcγRIIC/CD32C), o en la cadena γ común (γc), dímero transmembrana que se asocia al receptor (en el caso de FcγRI/CD64 y FcγRIIIA/CD16A). En las células NK, FcγRIIIA/CD16A se asocia con la cadena ζ del receptor de los linfocitos T.<sup>319</sup> El receptor FcγRIIB/CD32B transmiten señales inhibitoras mediante sus motivos ITIM. Finalmente, FcγRIIIB/CD16B se encuentra anclado a la membrana plasmática mediante un enlace tipo glicosil fosfatidil inositol (GPI) y no dispone de regiones transmembrana o citoplasmática mediadoras de señales intracelulares.<sup>320</sup> No obstante, este receptor parece intervenir en la fagocitosis y la respiración celular del neutrófilo activándolo ante una eventual agresión,<sup>321</sup> y se ha insinuado que podría ejercer como receptor *decoy* y participar en el *clearance* de ICs circulantes (ver **figura 3.1**).<sup>322,323</sup>

### 4.4. Presencia de los FcγRs en el SI

Los FcγRs se expresan fundamentalmente en células hematopoyéticas, aunque también se han detectado en células endoteliales, osteoclastos, células mesangiales, microglía, queratinocitos y células de glándulas salivales.<sup>302,320</sup> En las células del SI la distribución de los FcγRs es heterogénea.<sup>302</sup> La mayoría de células coexpresan receptores activadores e inhibidores a excepción de las células NK, que sólo expresan receptores activadores, fundamentalmente FcγRIIIA/CD16A y en menor grado FcγRIIC/CD32C,<sup>324,325</sup> y los linfocitos B y células plasmáticas, que parecen expresar únicamente el receptor inhibitor FcγRIIB/CD32B.<sup>302</sup> Con respecto a los receptores activadores, los neutrófilos sólo expresan FcγRIIA y FcγRIIIB,<sup>326</sup> mientras que los monocitos, macrófagos y células dendríticas (DCs) expresan todos los tipos a excepción de FcγRIIC y FcγRIIIB. Finalmente, los basófilos y los mastocitos expresan fundamentalmente FcγRIIB (**Figura 1**).

### 4.5. Espectro de afinidad de los FcγRs por la IgG

Clásicamente, FcγRI/CD64 ha sido considerado como el único FcγR de alta afinidad ( $K_a > 10^7 M^{-1}$ ) siendo el único receptor capaz de ligar IgG monomérica. Habitualmente está

saturado por la elevada presencia de Acs monoméricos en el torrente sanguíneo y, por tanto, tiene escaso acceso a los ICs.<sup>302</sup> Por el contrario, el resto de FcγRs presentan una afinidad casi 100 veces menor para la IgG monomérica por lo que prácticamente solo se unen a ICs. Ello previene la activación inespecífica por IgG monomérica de los potentes receptores pro-inflamatorios como FcγRIIA y FcγRIIIA.<sup>303</sup> Así, los FcγRs de ‘baja afinidad’ van a presentar una actividad biológica más relevante que los de ‘alta afinidad’ permitiendo a los Acs (en forma de ICs) modular eficientemente acciones celulares durante las respuestas inmunitarias mediadas por Acs.<sup>327</sup>

La afinidad de los FcγRs depende además de los isotipos de IgG.<sup>324</sup> De hecho, FcγRI pese a ser un receptor de alta afinidad para IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>, no es capaz de unirse a IgG<sub>2</sub>.<sup>327</sup> Por su parte, los receptores llamados de ‘baja afinidad’ presentan también afinidades distintas según el isotipo de IgG. La IgG<sub>1</sub> se une con especial afinidad a FcγRIIA, FcγRIIC y FcγRIIB, y con menor afinidad a FcγRIIIA y FcγRIIIB. FcγRIIIA se une con especial afinidad a IgG<sub>3</sub>, mientras que FcγRIIA es el receptor con más afinidad por IgG<sub>2</sub>. Por su parte, FcγRIIB presenta la afinidad más baja de todos los FcγR para IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub> (**Figura 1**).<sup>327</sup>

En definitiva, cada FcγR presenta una determinada afinidad para cada isotipo de IgG, y dado que la naturaleza de la respuesta inmunitaria determina el isotipo predominante en ella, a su vez define el subtipo de FcγR que mediará esa respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la opsonización de microorganismos encapsulados dirigida fundamentalmente por IgG<sub>2</sub>, determinará que FcγRIIA sea el FcγR más relevante. La complejidad de la interacción IgG-FcγR aumenta aún más si cabe, si consideramos la existencia de polimorfismos genéticos en los FcγR que modifican su afinidad para isotipos concretos de IgG, como se desarrollará más adelante.

#### **4.6. Factores adicionales que modulan la unión IgG-FcγR**

La intensidad de la respuesta mediada por FcγRs depende de la afinidad del receptor por sus ligandos (serotipos de IgG e ICs), pero puede verse afectada críticamente por una serie de factores adicionales entre los que destacan:

### 4.6.1. Mediadores que regulan la expresión de FcγR

El ambiente de citocinas modifica el balance entre FcγRs activadores e inhibidores existentes en la membrana plasmática, determinando así el umbral de activación celular tras la exposición a ICs. Así, la densidad de FcγRs activadores en la membrana aumenta en presencia de estímulos proinflamatorios (p.e. LPS),<sup>328</sup> citocinas tipo Th1 (IFN-γ)<sup>329</sup> y anafilotoxinas (C5a).<sup>330</sup> Por el contrario, un predominio de citocinas Th2<sup>331</sup> (IL-4, IL-10) o TGF-β<sup>332</sup> reducen la expresión de FcγRs activadores y aumentan el número de FcγRIIB. Finalmente, el tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas provoca un aumento en la expresión de FcγRIIB en las células efectoras del SI innato, lo cual explicaría su efecto antiinflamatorio en diferentes enfermedades autoinmunitarias.<sup>303</sup>

### 4.6.2. Glicovariantes de IgG que modulan la unión a FcγR

Los estudios estructurales demuestran que la glicosilación de N297 de C<sub>H</sub>2 aumenta la afinidad de la interacción IgG-FcγR.<sup>302</sup> Por el contrario, la deglicosilación de la IgG disminuye de manera importante su unión con FcγR.<sup>333</sup> Además, el grupo azucarado presenta una gran variabilidad en cuanto a sus residuos, pudiendo presentar por ejemplo fucosa, galactosa, ácido siálico y GlcNac. En individuos sanos pueden observarse hasta 40 glicovariaciones.<sup>333</sup> Estas glicovariaciones también afectan a la unión de FcγR con IgG y por tanto a su actividad *in vivo*. Por ejemplo, la ausencia de fucosa aumenta la afinidad de todas las subclases de IgG por FcγRIIIA.<sup>302</sup> Por su parte, las IgG con ácido siálico presentan una menor afinidad por los FcγRs.<sup>334</sup> El patrón de glicosilación de la IgG se encuentra alterado en diferentes enfermedades autoinmunitarias,<sup>303</sup> lo cual apoya la teoría que estas glicovariaciones podrían modular la capacidad inflamatoria de la IgG a través de los FcγR. Estas propiedades otorgadas por el grado de glicosilación de la IgG pueden aplicarse en el diseño de los fármacos biológicos para mejorar su perfil farmacocinético.<sup>335</sup>

En conclusión, pese a la similitud estructural y cercanía genómica de los distintos FcγRs, las funciones que estos receptores desarrollan en una determinada respuesta inmunitaria dependerán de:

- 1) el grado de afinidad por un determinado isotipo de IgG;
- 2) su patrón de distribución en las diferentes células del SI;
- 3) el tipo de señal intracelular que desencadene (activadora o inhibidora);
- 4) la presencia de determinados mediadores inflamatorios, así como de
- 5) el estado de glicosilación de IgG que modificará su afinidad por el Fc $\gamma$ R.

#### **4.7. Funciones inmunológicas inducidas por Fc $\gamma$ R**

Los Fc $\gamma$ Rs median diferentes funciones celulares dependientes de IgG tanto en el brazo eferente como aferente del SI. El tipo de función celular va a depender del tipo celular implicado y la densidad de receptores activadores (dependientes de ITAM) e inhibidores (dependientes de ITIM, presente únicamente en Fc $\gamma$ RIIB) presentes en la membrana plasmática, así como de la afinidad de dichos receptores por el isotipo de IgG que predomine en los ICs que inducen la respuesta inmunitaria.<sup>303</sup>

##### **4.7.1. Funciones eferentes**

En los neutrófilos, la fagocitosis de agentes microbianos opsonizados por IgG está mediada por señales cooperativas desencadenadas por Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIB.<sup>326,336</sup> Asimismo, la activación de los Fc $\gamma$ Rs activa la respiración celular y secreción de especies reactivas de oxígeno, proteasas, y mediadores inflamatorios.<sup>321</sup> En macrófagos, los Fc $\gamma$ R activadores median diferentes acciones tales como fagocitosis, degranulación, ADCC y liberación de especies reactivas de oxígeno, interleucinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), factores de crecimiento y quimiocinas.<sup>337</sup> Las células NK presentan fundamentalmente Fc $\gamma$ RIIA en superficie que, al entrar en contacto con células opsonizadas con IgG, activa la ADCC y la liberación de interleucinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12.<sup>338</sup> Los Fc $\gamma$ Rs de mastocitos y basófilos tisulares actúan (junto con los receptores del complemento) como sensores frente a ICs y modulan la activación celular mediada por IgE regulando la liberación de sustancias vasoactivas y mediadores quimiotácticos que permitirán el acceso de otras células al foco inflamatorio.<sup>339</sup>

De este modo, los Fc $\gamma$ Rs expresados en macrófagos, neutrófilos, basófilos y mastocitos constituyen receptores puente entre la especificidad de los Acs generados por el SI adaptativo y las potentes funciones efectoras del sistema innato.<sup>302</sup>

### 4.7.2. Funciones aferentes

Los Fc $\gamma$ Rs desarrollan varias funciones en las DCs, directoras de orquesta de las respuestas adaptativas tanto celulares como humorales. En primer lugar, la fagocitosis de antígenos presentes en ICs para su procesamiento y posterior presentación mediante moléculas HLA tipo I y tipo II a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, respectivamente, depende de los Fc $\gamma$ Rs, y promueve la generación de respuestas inmunitarias más potentes en comparación con la simple internalización de antígenos libres.<sup>340</sup>

En un segundo lugar, los Fc $\gamma$ Rs contribuyen al balance de señales activadoras/inhibidoras dependiente de ICs que determinará el estado de reposo o maduración de las DCs. De este modo, los Fc $\gamma$ Rs influyen en la interacción entre DCs y células T y la intensidad de la respuesta inmunitaria adaptativa. Así, las DCs en estado de reposo pueden inactivar a células T que hayan escapado a los mecanismos centrales de tolerancia en el timo o, por el contrario, activar y expandir clones de células T potencialmente autoreactivas. Además, Fc $\gamma$ RIIB desarrolla un papel destacado en la prevención de la maduración espontánea de DCs en condiciones no inflamatorias, evitando así la iniciación de respuestas autoinmunitarias.<sup>341</sup> Entre los numerosos ligandos y receptores capaces de modular el estado de las DCs, los Fc $\gamma$ R son de los más relevantes.

Por otro lado, destacar el papel central de Fc $\gamma$ RIIB en la regulación de las respuesta humoral tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La maduración de las células B en células plasmáticas productoras de Acs de alta afinidad tiene por objeto minimizar la aparición de Acs de baja afinidad que pueden presentar reacción cruzada con autoantígenos. No obstante, pueden aparecer células B potencialmente autoreactivas durante los procesos de reordenamiento aleatorio de los segmentos de los genes de los Acs en la médula ósea, o de hipermutación somática y de maduración de la afinidad en el bazo y ganglios linfáticos.<sup>342</sup> Fc $\gamma$ RIIB debido a su carácter inhibitor, supone un mecanismo de control de posibles células B autoreactivas en los estadios finales de la maduración periférica, evitando la aparición de células plasmáticas productoras de autoAc. Al entrar en contacto con los ICs, las células autoreactivas con BCR de baja afinidad transmitirían solo una señal mediada por Fc $\gamma$ RIIB y no por BCR condenando a la célula a entrar en apoptosis. Sin embargo, las células B que recibieran una señal mediada por su BCR de alta afinidad y por

Fc $\gamma$ RIIB podrían completar su proceso de maduración y convertirse en células plasmáticas.<sup>303</sup>

Finalmente, el propio Fc $\gamma$ RIIB ejerce un efecto directo en la homeostasis de las células plasmáticas mediante el cual, cuando ésta entra en contacto con múltiples ICs, conduce a la apoptosis. De este modo, Fc $\gamma$ RIIB establece un mecanismo de *feedback* negativo para evitar la producción excesiva de Acs.<sup>302</sup>

#### 4.8. Polimorfismos genéticos de *FCGRs*

La existencia de polimorfismos genéticos de *FCGR* con relevancia funcional conlleva una variabilidad interindividual con respecto a las funciones inmunitarias previamente mencionadas. Dichos polimorfismos modifican la intensidad de las acciones dependientes de Fc $\gamma$ Rs lo que puede suponer una protección o susceptibilidad mayor para enfermedades autoinmunitarias o infecciosas. Además, estos polimorfismos influyen en la interacción entre los AcMos terapéuticos y los Fc $\gamma$ Rs, condicionando una mayor o menor eficacia clínica de dichos agentes. De entre los polimorfismos descritos de *Fc $\gamma$ Rs*, destacan por su repercusión funcional y relevancia clínica los SNPs *FCGR1IA-H131R* y *FCGR1IIA-V158F*.

##### 4.8.1. *FCGR1IA-H131R* (rs1801274)

Una variación puntual de G>A en el exón 4 del gen *FCGR1IA* supone una sustitución de histidina (H) por arginina (R) en la posición 131 del dominio extracelular. Este SNP identificado como rs1801274 afecta a la afinidad del receptor por la IgG, de modo que la variante *FCGR1IA-R131* presenta una menor afinidad que *FCGR1IA-H131* para IgG<sub>1</sub> pero especialmente para IgG<sub>2</sub>,<sup>327</sup> que supone a su vez una menor activación celular. Dijstelbloem et al,<sup>343</sup> observaron que la vida media de eritrocitos opsonizados con IgG fue mayor en individuos afectados de LES homocigotos *FCGR1IA-R131*, lo que demuestra *in vivo* la alteración de la capacidad fagocítica asociada a este polimorfismo. Asimismo, fagocitos procedentes de individuos homocigotos *Fc $\gamma$ RIIA-H131* presentaron mayor actividad celular al ser enfrentados a bacterias opsonizadas<sup>344</sup> e IC con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).<sup>345</sup>

### 4.8.2. *FCGR3A-V158F* (rs396991)

Un cambio de T > G en el nucleótido 559 de *FCGR3A* (rs396991), supone un cambio aminoacídico de valina (V) a fenilalanina (F) en la posición 158 de la proteína.<sup>344</sup> Esta sustitución tienen lugar en el dominio extracelular D2 y determina una menor afinidad de *FcγR3A* para los isotipos IgG<sub>1</sub> IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub>,<sup>327</sup> que se traduce en una menor actividad del receptor demostrada en ensayos experimentales donde células NK procedentes de donantes homocigotos *FCGR3A-V158* presentaron una mayor actividad ADCC en comparación con las procedentes de donantes homocigotos *FCGR3A-F158*.<sup>346</sup> Recientemente, dos grupos independientes<sup>347</sup> han demostrado en ensayos de ADCC que las células NK que presentan el alelo V producen una mayor lisis de células tumorales<sup>348</sup> inducida por Cetuximab (un AcMo IgG<sub>1</sub> dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico o EGFR).

Estudios similares han sido desarrollados con Rituximab (AcMo anti-CD20) obteniéndose los mismo resultados. Dall'Ozzo et al., observaron que células NK de donantes homocigotos *FCGR3A-V158* producían mayor lisis de células CD20+ tras unirse con mayor afinidad a Rituximab.<sup>349</sup> Posteriormente, Hatjiharissi et al. demostraron que tanto la afinidad de la unión de Rituximab al receptor como la ADCC mediada por esta unión mostraban eran directamente proporcionales a la presencia del alelo de alta afinidad V, siendo en orden creciente mayor para FF < VF < VV.<sup>350</sup> Además, el alelo de baja afinidad *FCGR3A-F158* se ha asociado a una menor expresión del receptor y el genotipo homocigoto de baja afinidad *FcγR3A-F158* con un menor presencia del receptor en la superficie celular de células NK.<sup>350</sup>

### 4.8.3. Relevancia clínica de los polimorfismos de *FCGRs* en patología autoinmunitaria

Los polimorfismos de *FCGR2A-H131R* y *FCGR3A-V158F* han sido exhaustivamente estudiados tanto en el campo de la autoinmunidad como en la patología infecciosas.<sup>351</sup> A continuación, se presentan los aspectos más relevantes en cuanto a la enfermedad autoinmunitaria se refiere.

En los últimos diez años, los polimorfismos de *FCGRs* han sido relacionados con numerosas enfermedades autoinmunitarias, tanto como factores de susceptibilidad genética como factores modificadores del fenotipo. Los polimorfismos y genotipos implicados difieren según la enfermedad y los mecanismos específicos de la inmunopatogenia de cada proceso (p. ej., el subtipo de IgG y FcγR o las células implicadas). En algunas de estas patologías, la evidencia científica acerca del papel de estos polimorfismos es muy robusta, incluso probada en modelos experimentales animales, mientras que en otras es aún controvertida en términos clínicos, pese a la existencia de una aparente conexión patogénica.

La relación entre los polimorfismos de *FCGRs* y el LES ha sido ampliamente estudiada.<sup>352</sup> Un metanálisis en el que se incluyó un total de 5.741 pacientes con LES y 6.530 controles concluyó que la homocigosidad para los alelos de baja afinidad *FCGRIIA-R131* y *FCGRIIIA-F158* son factores de susceptibilidad para el desarrollo de esta enfermedad, en consonancia con otros estudios anterior publicados.<sup>353,354</sup> El efecto de *FCGRIIA-131RR* es más acusado en población afroamericana, mientras que en el caso de *FCGRIIIA-158FF* la relación es más importante en población caucásica.<sup>353</sup> Otros estudios han demostrado la asociación entre *FCGRIIA-H131R* y *FCGRIIIA-F158V* con el LES y la presencia de Nefritis Lúpica, destacando así su papel como factor modificador de la enfermedad, si bien la influencia de estos polimorfismos depende del grupo étnico estudiado.<sup>306,355,356</sup> Dai et al. confirmaron la relación entre *FCGRIIIA-158FF* y el LES en pacientes chinos y observaron una relación entre el genotipo de baja afinidad FF con la serositis, pero no con la Nefritis Lúpica.<sup>357</sup> Patogenéticamente hablando, la presencia de alelos de baja afinidad de *FCGRIIA* y *FCGRIIIA*, podría suponer una menor eliminación de ICs y células apoptóticas por parte de fagocitos, lo que favorecería la sensibilización del SI frente a moléculas endógenas como los ácidos nucleicos, la formación de autoAcs y el desarrollo del LES.<sup>358</sup>

En la AR, el daño tisular parece estar mediado por autoAcs IgG, que se depositan en la articulación y que dan lugar a respuestas inflamatorias mediadas por FcγRs presentes en diferentes células efectoras.<sup>351</sup> Numerosos estudios clínicos han revelado una asociación entre el alelo de alta afinidad *FCGRIIIA-V158* y la AR.<sup>359</sup> Kastbom et al. observaron

## INTRODUCCIÓN

además, una asociación entre el alelo *FCGR3A-V158* y una mayor gravedad en pacientes varones con AR precoz.<sup>360</sup> La condición étnica como en el LES también influye en la susceptibilidad a AR. Un reciente meta-análisis en el que se incluyeron 4.418 pacientes y 3.560 controles concluyó que tanto *FCGR3A-V158* como *FCGR2A-H131* se asociaban a AR en pacientes europeos pero no en pacientes asiáticos.<sup>307</sup>

Los polimorfismos de *FCGRs* también se han relacionado con enfermedades autoinmunitarias hematológicas. Así, 2 estudios han asociado el alelo de alta afinidad *FCGR3A-V158* con la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), donde los macrófagos fagocitan, a través de FcγR, plaquetas opsonizadas por autoAcs.<sup>359</sup> Este resultado ha sido recientemente demostrado en un meta-análisis con más de 700 pacientes con PTI.<sup>361</sup> En el síndrome antifosfolipídico (SAF), un meta-análisis demostró que el genotipo homocigoto *FCGR2A-H131* se asocia al desarrollo de esta enfermedad trombótica.<sup>308</sup> Este resultado tendría base patogénica, ya que en el SAF existe una respuesta autoinmunitaria predominantemente IgG2 y las células efectoras son fundamentalmente plaquetas y células endoteliales que únicamente expresan FcγRIIA. Otras enfermedades reumatológicas en las que se han implicado los polimorfismos de *FCGRs* son las vasculitis ANCA+, la Enfermedad de Kawasaki, la Arteritis de Células Gigantes, la Enfermedad de Beçhet y la Miopatía Inflamatoria Idiopática.<sup>359</sup>

Los polimorfismos de *FCGRs* también han sido relacionados con patología autoinmunitaria neurológica. En la Miastenia Gravis, la presencia de autoAcs (fundamentalmente de tipo IgG2) dirigidos contra el receptor de la acetilcolina (AChR) postsináptico induce degradación del receptor y por tanto un fallo en la transmisión neuromuscular que produce debilidad muscular. Los autores de dos estudios con 107 y 47 pacientes afectados de Miastenia Gravis observaron que el genotipo homocigoto *FCGR2A-H131* era más frecuente entre los casos en comparación con el grupo control.<sup>362,363</sup> Este genotipo podría favorecer una menor degradación de ICs que contuviesen Acs anti-AChR, los cuales inducirían una estimulación prolongada de células T autoreactivas dando lugar al fenotipo clínico. Otras patologías neurológicas en las que se han implicado a los polimorfismos de *FCGRs* son la Esclerosis Múltiple, el Síndrome de Guillain- Barré y la Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica.<sup>359</sup>

En la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, un estudio reciente que incluyó 6.570 pacientes Caucásicos demostró un componente protector del genotipo homocigoto *FCGR2A-R131*.<sup>364</sup> Los resultados de este trabajo referidos a Colitis Ulcerosa coinciden con los de otros 2 estudios GWAS realizados en población japonesa<sup>365</sup> y Caucásica, respectivamente.<sup>366</sup> Otras patologías digestivas autoinmunitarias en las que se ha observado una asociación positiva con los polimorfismos de *FCGRs* son la Celiaquía y la DM tipo 1.<sup>367</sup>

#### **4.9. *FCGRs* como marcadores farmacogenéticos**

En los últimos años, el estudio de los polimorfismos de *FCGRs* como marcador predictivo al tratamiento biológico ha despertado un gran interés. Los fármacos biológicos han revolucionado el tratamiento de numerosas enfermedades oncológicas, hematológicas y autoinmunitarias o inflamatorias (incluyendo la Psoriasis) mejorando notablemente la eficacia y seguridad de los tratamientos clásicos y a la postre el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, no todos los pacientes responden satisfactoriamente y un porcentaje no despreciable fracasa con estos tratamientos. Además, su elevado coste económico limita su uso en la práctica clínica. Factores genéticos implicados en la farmacodinámica y/o farmacocinética del tratamiento biológico podrían modificar su eficacia y establecerse como marcadores de respuesta. Dado que estos fármacos interactúan con las células inmunitarias a través de los FcγRs, los polimorfismos *FCGRs* se han postulado como un marcador farmacogenético capaz de influir en la respuesta al tratamiento biológico. Esta búsqueda ha sido impulsada por el desarrollo de la farmacología, la necesidad de una mayor rentabilidad terapéutica y la búsqueda de una medicina personalizada.

La mayoría de los agentes biológicos presentan una estructura similar a la inmunoglobulina, en forma de AcMo, con un fragmento variable (Fv) y otro fragmento constante (Fc). La parte variable del fármaco presenta especificidad para su 'diana' terapéutica y está diseñada para identificar células neoplásicas, bloquear citocinas, interceptar factores de crecimiento u otras moléculas según la fisiopatogenia de la enfermedad a tratar. En Psoriasis, los fármacos biológicos interceptan TNF- $\alpha$ , IL-12/IL-23 o IL-17, citocinas e interleucinas relevantes en su fisiopatogenia.

## INTRODUCCIÓN

Por otro lado, el Fc de estos fármacos suele ser de la IgG1. Mediante este fragmento, los fármacos biológicos interactúan con las células inmunitarias que expresen FcγRs en su membrana plasmática. La presencia o no de pequeñas secuencias de origen no humano en la parte variable clasifica estos fármacos en Acs quiméricos, humanizados o humanos. Etenercept, la excepción, es una proteína de fusión cuya parte variable está constituida por la unidad del receptor TNF- $\alpha$  p75 (ver **Figura 7** sección *Psoriasis*). Estos fármacos ejercen su función mediante:

- a) su Fv, con el bloqueo de importantes citocinas relevantes en la fisiopatología de la Psoriasis (p.e. TNF- $\alpha$ ) y
- b) su Fc, la Fc de la IgG1, capaz de desencadenar en las células inmunitarias distintas funciones celulares incluyendo la ADCC, la producción de citocinas, la inducción de apoptosis o la fagocitosis de los ICs (y consecuentemente del fármaco biológico).

Estas funciones celulares inducidas con mayor o menor intensidad según la afinidad entre Fc de la IgG1 y FcγRs son clave para la eficacia del tratamiento. Por ello, el estudio de los polimorfismos *FCGRs* que modifican la afinidad por la Fc de la IgG en la respuesta al tratamiento biológico ha sido motivo de importantes trabajos farmacogenéticos.<sup>359</sup>

### **4.9.1. Polimorfismos *FCGRs* en el tratamiento biológico de patología neoplásica**

La primera evidencia de la influencia de los polimorfismos *FCGRs* en el tratamiento con fármacos biológicos fue publicada en 2002, cuando Cartron et al,<sup>368</sup> demostraron que pacientes con Linfoma No-Hodgkin (LNH) y alotipo *FCGR3A-V158* presentaban una mejor respuesta a Rituximab (AcMo terapéutico anti-CD20) probablemente por una mayor afinidad de las células NK a Rituximab mediada por FcγRIIIA y, en consecuencia, a una mayor ADCC frente linfocitos neoplásicos CD20+.<sup>350</sup> Estudios en modelos murinos han demostrado que el efecto citotóxico antitumoral de estas terapias reside fundamentalmente en el sistema FcγR.<sup>351</sup> Estos resultados han sido replicados en estudios posteriores en pacientes tratados con Rituximab por LNH<sup>369</sup> y otros procesos linfoproliferativos.<sup>370,371</sup> Sin

embargo, otros autores no han demostrado influencia alguna en la respuesta a Rituximab en el tratamiento del LNH. Incluso algunos autores observaron una mejor respuesta en pacientes con el genotipo homocigoto de baja afinidad *FCGR2A-R131* sin detectar influencia alguna para *FCGR3A-V158F*.<sup>372</sup> Quizá, el uso de los agentes citostáticos clásicos junto a Rituximab deteriora el efecto ADCC de los polimorfismos *FCGRs*. Otra posible explicación apunta a la elevada dosis utilizada de Rituximab en estos regímenes terapéuticos que, al saturar los receptores, anularía el efecto más sutil del polimorfismo en la afinidad por la Fc IgG1. Un reciente meta-análisis concluyó que si bien el polimorfismo *FCGR3A-V158* parece modificar la respuesta al tratamiento con Rituximab en pacientes con LNH, su débil influencia y diferencias étnicas en las poblaciones estudiadas no permiten en la actualidad realizar una recomendación sólida respecto a su uso como marcador farmacogenético en el tratamiento del LNH con Rituximab.<sup>312</sup>

Posteriormente, otros autores demostraron la influencia de los polimorfismos de *FCGRs* en la respuesta a otros AcMos en otras enfermedades neoplásicas. Bibeau et al,<sup>373</sup> observaron un mayor tiempo libre de progresión en los pacientes con cáncer colorrectal (CCR) metastático y genotipos homocigotos de alta afinidad *FCGR2A-H131* y *FCGR3A-V158* tratados con Cetuximab (AcMo terapéutico anti-EGFR). Este estudio confirmaba los resultados de un estudio piloto previo realizado en 39 pacientes.<sup>374</sup> Recientemente, un ensayo clínico con Cetuximab confirmó la asociación entre el genotipo homocigoto de alta afinidad *FCGR2A-H131* y una mejor respuesta terapéutica.<sup>314</sup> El análisis de los resultados observados en el estudio de *FCGR3A-V158F* es más complejo y existen resultados contradictorios si bien en este mismo estudio no observaron ninguna influencia en la supervivencia global o en el tiempo libre de progresión.

Del mismo modo, los polimorfismos de *FCGR2A-H131R* y *FCGR3A-V158F* también han sido estudiados en la respuesta al cáncer escamoso de cabeza y cuello observando resultados beneficiosos en pacientes portadores de los polimorfismos de alta afinidad.<sup>375</sup> Finalmente, Trastuzumab, un AcMo terapéutico anti-HER2/neu, también parece presentar una respuesta terapéutica dependiente de los polimorfismos *FCGR* en el tratamiento del cáncer de mama (CM) metastático.<sup>376</sup> Un estudio basado en pacientes incluidos en un ensayo clínico demostró un mayor efecto terapéutico en pacientes portadores del alelo de

## INTRODUCCIÓN

alta afinidad *FCGR3A-V158*, señalando este polimorfismo como marcador farmacogenético en la respuesta al tratamiento adyuvante del cáncer de mama ERBB2/HER2+ con Trastuzumab.<sup>313</sup>

Sin embargo, en una amplia revisión donde se analizó la influencia de los polimorfismos de *FCGR2A-H131R* y *FCGR3A-V158F* en el tratamiento del cáncer con Rituximab, Cetuximab y Trastuzumab incluyendo pacientes con LNH, CCR, y CM, concluyó que si bien estos polimorfismos pueden ser un factor genético que contribuya a la eficacia del tratamiento antitumoral con agentes biológicos, otros factores parecen ser también importantes por lo que su impacto parece ser discreto.<sup>377</sup>

### **4.9.2. Polimorfismos *FCGRs* en el tratamiento biológico de la patología inflamatoria**

Los fármacos biológicos también han sido diseñados para el tratamiento de enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria. Su mecanismo de acción se basa principalmente en la ADCC mediada por Fc $\gamma$ R, eliminando células inmunitarias hiperactivadas (p. ej., Rituximab eliminando células B patogénicas en el tratamiento del Pénfigo vulgar), o en la bloqueo selectivo de moléculas solubles como las citocinas implicadas en la patogenia de la enfermedad a tratar (p. ej., Adalimumab, un AcMo anti-TNF- $\alpha$  en la Psoriasis). El bloqueo de estas citocinas por el fármaco biológico formaría ICs que serían eliminados de la circulación mediante los Fc $\gamma$ Rs de los fagocitos. Por todo ello, los polimorfismos de *FCGRs* son considerados potenciales marcadores farmacogenéticos en el tratamiento biológico de patología inflamatoria tanto desde un punto de vista farmacodinámico como farmacocinético.

Los primeros autores en aportar evidencias sobre la relación entre los polimorfismos de *FCGRs* y el tratamiento anti-TNF en patología inflamatoria fueron Louis et al. en 2004.<sup>316</sup> Estos autores observaron una mejor respuesta a infliximab en pacientes con EC portadores del genotipo homocigoto de alta afinidad *FCGR3A-V158*. Los autores sugirieron que la mejor respuesta clínica de este genotipo en la EC podría estar mediada por una mayor ADCC de células mononucleares patogénicas que expresaran TNF- $\alpha$  en su membrana

plasmática.<sup>378</sup> Sin embargo, estos mismos autores no pudieron replicar sus resultados en un posterior estudio.<sup>379</sup> Ternant et al. obtuvieron resultados similares en una cohorte de 111 pacientes con EC observando que el *clearance* del fármaco era mayor en pacientes con genotipo homocigoto de alta afinidad *FcγRIIIA-V158*.<sup>380</sup> Moroi et al. observaron diferencias en los parámetros biológicos de respuesta en las fases iniciales del tratamiento, postulando un posible papel a la mayor ADCC mediada por el genotipo homocigoto de alta afinidad *FCGR11A-V158*.<sup>378</sup> Finalmente, Romero-Cara et al. observaron que los pacientes con EC con genotipo homocigoto de alta afinidad *FcγRIIIA-V158* tratados con INF o Adalimumab desarrollaban más Acs anti-fármaco y que ello podría explicar la necesidad de una mayor dosificación para mantener la eficacia del fármaco.<sup>381</sup> Sin embargo, otro estudio que incluyó 41 pacientes con EC no encontró relación alguna entre la eficacia de INF y los polimorfismos de *FCGR11A-H131R* o *FCGR11A-V158F*, pero sí con un polimorfismo de *FCGR11B*.<sup>382</sup>

En relación a la patología reumática, diversos estudios también han relacionado los polimorfismos de *FCGRs* con la respuesta al tratamiento anti-TNFα en la AR y otros tipos de artritis inflamatoria como la APs y la EA. En 2004, Tutuncu et al. fueron los primeros en detectar la influencia de los polimorfismos *FCGR11A-H131R* o *FCGR11A-V158F* en la respuesta al tratamiento anti-TNFα.<sup>383</sup> Cañete et al.<sup>384</sup> publicaron en 2009 el primero de una serie de artículos que analizaban esta asociación posteriormente estudiada y replicada en cohortes independientes.<sup>385,386</sup> El análisis de los resultados de estos estudios es complejo dada la variabilidad entre poblaciones estudiadas, fármacos biológicos anti-TNFα utilizados y el momento de la valoración terapéutica. Un meta-análisis en el que se incluyeron 6 estudios concluyó que el genotipo homocigoto de baja afinidad *FCGR11A-131RR* se asocia a mejor respuesta a ADA en pacientes con AR.<sup>387</sup> Por otro lado, los estudios en pacientes con espondiloartropatía mostraron que, al contrario que en la AR, los genotipos homocigotos de alta afinidad de *FCGR11A-R131* eran los que se asociaban a una mejor respuesta terapéutica.<sup>388,389</sup>

Finalmente, destacar que un meta-análisis realizado en 2016 en el que se incluyeron pacientes con EC, EA y Psoriasis tratados con fármacos biológicos anti-TNFα, concluyó que, de manera global, la presencia de los alelos de baja afinidad de *FCGR11A-H131R* y el

## INTRODUCCIÓN

alelo de alta afinidad *FCGR3A-V158F* se asociaban a una mejor respuesta terapéutica tras 6 meses de seguimiento.<sup>390</sup> Estos resultados, deberían ser analizados de manera individualizada por enfermedad ya que cada una responde a distintos procesos patológicos en los que los FcγRs desarrollan distintos papeles inmunopatogénicos.

En cuanto a la Psoriasis, en el momento de la publicación de nuestro estudio no existía ningún trabajo que analizara el papel de los polimorfismos *FCGRs* en el tratamiento biológico anti-TNF. Posteriormente, aparecieron otros trabajos similares<sup>391,392</sup> que dada su analogía serán discutidos en el apartado *Discusión* de la presente Tesis Doctoral.

# **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

---



## II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La idea que subyace en la presente Tesis Doctoral es que polimorfismos genéticos funcionalmente relevantes de determinados receptores implicados en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa pueden tener un papel importante en cuanto a la susceptibilidad, expresión y respuesta al tratamiento en la enfermedad psoriásica.

### **1. Polimorfismos de los *TLRs* como factor de susceptibilidad y/o modificador de la enfermedad psoriásica, y factor predictivo al tratamiento con fototerapia UVBnb**

En el momento en que se diseñó el estudio, los conocimientos acerca de la respuesta inmunitaria adaptativa en psoriasis eran notables, con descripción de nuevas subpoblaciones de células T (p.e. Th17, Th22) y DCs implicadas, y nuevos fármacos biológicos desarrollados muy eficaces en el tratamiento de la enfermedad (p.e. ustekinumab, secukinumab). Sin embargo, poco se conocía sobre el origen de la respuesta inflamatoria innata en psoriasis.

Dado el papel clave de los TLRs en la iniciación, promoción y amplificación de dicha respuesta inflamatoria, y la existencia de distintos factores desencadenantes o exacerbantes en psoriasis, pensamos que polimorfismos genéticos capaces de modular la actividad de estos receptores pueden ser marcadores de susceptibilidad y/o modificadores de la enfermedad psoriásica (en cuanto a gravedad, precocidad de aparición y riesgo de APs) y, eventualmente, de la respuesta al tratamiento convencional con fototerapia UVBnb, cuya diana terapéutica, los queratinocitos y las DCs, son las principales células que expresan TLRs en piel.

## **2. Polimorfismos genéticos de los receptores linfocíticos *CD5* y *CD6* como factores de susceptibilidad y/o modificadores de la enfermedad psoriásica**

CD5 y CD6 son receptores linfocitarios altamente homólogas que transducen señales intracelulares capaces de modular las respuestas linfocitarias durante el reconocimiento específico de antígenos por parte de linfocitos T y B1a, ambos implicados en procesos autoinmunitarios. A partir de la única evidencia disponible sobre la implicación de estos receptores en Psoriasis (obtenida en ensayos clínicos preliminares que demostraban la eficacia de itolizumab, un mAc anti-CD6, en el tratamiento de la psoriasis moderada-grave) se planteó la posibilidad de obtener evidencia experimental y genética adicional sobre dicha implicación mediante el estudio de: i) polimorfismos genéticos de CD5 y CD6 como posibles factores de susceptibilidad y/o modificadores de la enfermedad y ii) la deficiencia de CD6 en un modelo murino bien establecido de psoriasis inducido por imiquimod.

## **3. Polimorfismos genéticos de los *FcγRIIA* y *FcγRIIIA* como factores farmacogenéticos predictivos de la respuesta al tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$ de la psoriasis**

La introducción de los fármacos biológicos anti-TNF $\alpha$  en el tratamiento de la psoriasis revolucionó de manera inaudita el abordaje de la enfermedad. Sin embargo, la ausencia de respuesta al tratamiento en un porcentaje no despreciable de pacientes, plantea la necesidad de marcadores predictivos a este respecto. En base a evidencias disponibles sobre la influencia de polimorfismos de receptores para la región constante (Fc) de las inmunoglobulinas ( Fc $\gamma$ Rs) en la enfermedad tumoral y en otras enfermedades inflamatorias (principalmente en la AR) se planteó analizar la influencia de los mismos en el tratamiento biológico de la psoriasis a nivel farmacocinético y farmacodinámico.

## **OBJETIVOS**

---



### III. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis es estudiar la influencia inmunogenética de receptores de la inmunidad innata y adaptativa relevantes en la fisiopatogenia de la Psoriasis y su tratamiento biológico. Para ello, se estudiará el papel de polimorfismos funcionalmente relevantes de genes implicados en la activación y regulación de las respuestas inmunitarias innatas (*TLRs*, *FCGRs*) y adaptativas (*CD5*, *CD6*) como factor de susceptibilidad, modificador de enfermedad y/o predictor de respuesta al tratamiento con fototerapia UVBnb y al tratamiento biológico anti-TNF- $\alpha$  en Psoriasis.

Los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral se enumeran a continuación:

- 3.1. Estudio de polimorfismos funcionales de *TLRs* en Psoriasis vulgar como posible factor de susceptibilidad y/o modificador de enfermedad**
- 3.2. Estudio de polimorfismos funcionales de *TLRs* en pacientes con Psoriasis vulgar tratados con fototerapia UVBnb como posible factor predictivo de respuesta a al tratamiento**
- 3.3. Estudio de polimorfismos funcionales de *CD5* y *CD6* como posibles factores de susceptibilidad y/o modificadores de la enfermedad**
- 3.4. Estudio de polimorfismos funcionales de *FCGRs* como factor farmacogenético predictivo de la respuesta en el tratamiento biológico anti-TNF- $\alpha$  de la Psoriasis**



## **RESULTADOS**

---



#### IV. RESULTADOS

Los resultados de los distintos proyectos que se incluyen en esta Tesis Doctoral se presentan a continuación junto con las correspondientes publicaciones ordenadas en función de su papel en la fisiopatogenia de la enfermedad y en la respuesta al tratamiento en el Anexo I.

- Publicación Original 1 “Genetically defined variants of toll-like receptors 3, 7 and 9 as phenotype and risk modifier factors for Psoriasis.”
- Publicación Original 2: “Toll-like receptor 9 promoter polymorphism as a predictive factor of narrow-band UVB phototherapy response in patients with Psoriasis.”
- Publicación Original 3: “Genetic and experimental evidence for the involvement of the CD6 lymphocyte receptor in Psoriasis.”
- Publicación Original 4: “The role of Fcγ receptor polymorphisms in the response to anti-tumor necrosis factor therapy in Psoriasis: A pharmacogenetic study.”



## 1. Polimorfismos genéticos de los *TLRs* como factores de susceptibilidad y modificadores de la enfermedad en Psoriasis

### 1.1. Población a estudio

En este proyecto se incluyeron un total de 304 pacientes con Psoriasis y 305 individuos como grupo control poblacional. Las características clínico y demográficas de los pacientes se muestran en la **Tabla 3**. Entre los pacientes con Psoriasis, 181 pacientes eran varones (59.5%), y la edad media de los fue de 50 años ( $\pm$ SD 15.9, rango intercuartil 18-83 años), con una duración de la enfermedad de 18 años. La PV fue la forma más común representando el 89% de los casos. El 62.2% presentaron una Psoriasis moderada-grave definida por la necesidad de recibir tratamiento sistémico, fototerapia o terapia biológica (definición ya discutida en esta obra). La edad de debut de la enfermedad estaba disponible en 281 pacientes, siendo en 199 (70.8%) inferior a 40 años (media 21.3  $\pm$ SD 8.5, rango intercuartil 3-39) y en 82 (29.2%) >40 años (media 50.9  $\pm$ SD 8.2, rango intercuartil 40-77). Esta categorización definió el grupo de *Psoriasis de debut precoz* y *Psoriasis de debut tardío*. Finalmente, señalar que el 15.5% de pacientes asociaba artritis psoriásica.

Las características clínicas se compararon en función de la gravedad de la enfermedad. Es de destacar que los pacientes incluidos en el estudio presentaban un tiempo de seguimiento muy prolongado (seguimiento medio de 13 y 19,5 años en los grupos de Psoriasis leve y moderada-grave, respectivamente); este hecho refuerza la correcta clasificación de los pacientes ya que más de 5 años de seguimiento permite al paciente con Psoriasis potencialmente grave desarrollar las manifestaciones propias de la enfermedad y recibir tratamiento sistémico, biológico o fototerapia si así lo precisa. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación a la presencia de antecedentes familiares o forma clínica de la Psoriasis. Sin embargo, los pacientes con Psoriasis moderada-grave eran más jóvenes (53 vs 48 años;  $p=0.0427$ ), presentaron un debut más precoz (31 vs 27 años;  $p=0.0007$ ), una enfermedad más prolongada (13 vs 18 años;  $p=0.0056$ ), un mayor riesgo para desarrollar APs (7% vs 20.7%;  $p=0.0015$ ) y valores PASI más elevados ( $p<0.0001$ ) (ver tabla 1). Por otro lado, los pacientes con un

## RESULTADOS

**Tabla 3.** Características clínico-demográficas de la cohorte de pacientes con Psoriasis estudiada.

	Psoriasis leve		Psoriasis moderada-grave		Todos		p **
	n	%	n	%	n	%	
<b>n</b>	115	37.8	189	62.2	304	100	
<b>Edad (años)*</b>	53	[41-67]	48	[37-61]	50	[38-63]	<b>0.0427</b>
<b>Sexo</b>							
<b>Hombres</b>	62	54	119	63	181	59.5	0.1503
<b>Mujeres</b>	53	46	70	37	123	40.5	
<b>Edad de debut (años)*</b>	31	[19-51]	25	[16-35]	27	[18-41]	<b>0.0007</b>
<b>Edad &lt;40 años en el debut de la enfermedad</b>	64	59.8	135	77.6	199	70.8	<b>0.0023</b>
<b>Duración de la enfermedad (años)*</b>	13	[8-24]	19,5	[12-30]	18	[10-28]	<b>0.0056</b>
<b>Antecedentes familiares</b>	53	47.3	83	50	136	48.9	0.7521
<b>Artritis psoriásica</b>	8	7	39	20.7	47	15.5	<b>0.0023</b>
<b>Curso clínico persistente</b>	87	76.3	153	80.9	240	79.2	0.4137
<b>Curso clínico intermitente</b>	27	23.7	36	19.1	63	20.8	
<b>Subtipo de Psoriasis</b>							
<b>Vulgar</b>	121	89	16	84.2	137	88.4	0.7979
<b>Guttata</b>	7	5.2	2	10.5	9	5.8	
<b>Palmoplantar</b>	7	5.2	1	5.3	8	5.2	
<b>Inversa</b>	1	1	0	0	1	0.6	
<b>PASI</b>							
<3	50	43.5	5	2.7	55	18.2	<b>&lt;0.0001</b>
3-7	50	43.5	38	20.3	88	29.1	
>7	15	13	144	77	159	52.6	

\* mediana y rango intercuartil [IQR]. \*\* la comparación entre las variables continuas entre los dos grupos se realizó mediante el test Kruskal-Wallis, mientras que las frecuencias se compararon mediante el test Chi cuadrada. Abreviaturas: PASI = *Psoriasis Area and Severity Index*

debut precoz eran más jóvenes (44 vs 64 años;  $p < 0.0001$ ), presentaban una enfermedad más prolongada (23 vs 13 años;  $p < 0.0001$ ), una mayor historia familiar (77.7 vs 22.3%;  $p = 0.0149$ ), una enfermedad más grave (77.6 vs 22.4%  $p = 0.0019$ ) y unos valores PASI más elevados ( $p = 0.0039$ ). Esta relación entre la gravedad y el debut precoz de la enfermedad ha sido descrita en otros estudios.<sup>393,394</sup>

Las diferencias entre los pacientes con enfermedad leve vs moderada-grave fueron significativas en cuanto a la edad media (53 vs 48 años), la edad de debut (31 vs 27 años), la duración de la enfermedad (13 vs 18 años) y la presencia de artritis (7% vs 20.7%). Finalmente, los pacientes con Psoriasis moderada-grave presentaron índices PASI más elevados que los pacientes con Psoriasis leve. Todas estas características fueron incluidas junto al sexo en el análisis multivariante como posibles factores de confusión.

En cuanto al grupo control, elaborado con 305 individuos sanos de la misma población que los pacientes, se observó una edad media de 42 años ( $\pm$  SD13.6 años, rango intercuartil 18-68 años) y una ligero dominio del sexo masculino (53%).

## 1.2. Estudio genético

Se analizaron un total de 11 SNPs pertenecientes a los *TLR2*, 3, 4, 5, 7 y 9 (ver **tabla 2** en apartado *Introducción 2.7*) tanto en la cohorte de pacientes con Psoriasis como en el grupo control con un total de 3282 (% de éxito = 98.2%) y 3340 (% de éxito = 99.9%) secuenciaciones, respectivamente. 62 y 15 secuenciaciones de respectivos grupos no pudieron completarse por poca cantidad de muestra o baja calidad del DNA extraído.

### 1.2.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg

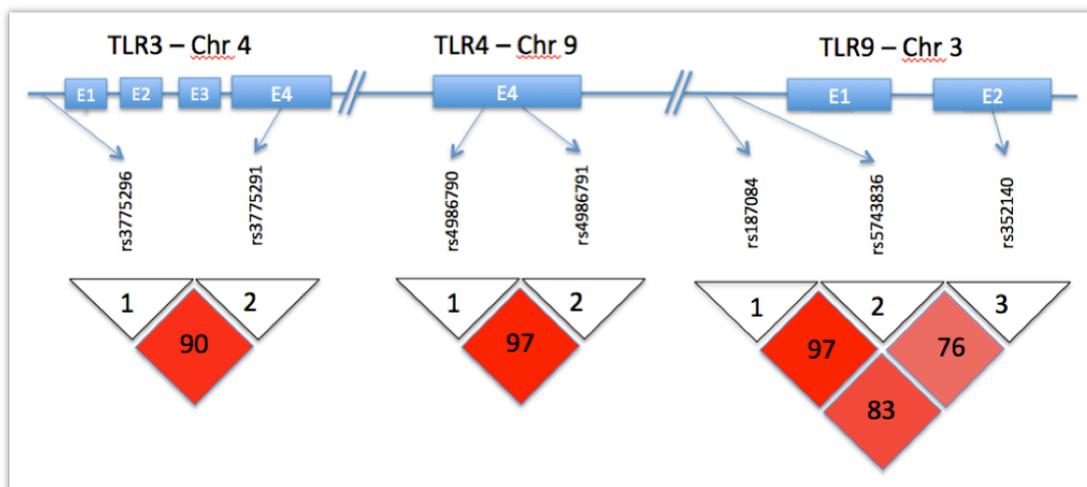
En primer lugar, se realizó un estudio genético para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y posibles *linkage disequilibrium* (LD) entre los SNPs analizados. El principio de HWE establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural u otros factores como la aparición de nuevas mutaciones, movimientos migratorios o el apareamiento seleccionado. Es decir, determina si la herencia de un determinado alelo en una población concreta es aleatoria o no. El análisis reveló que todos los SNPs se encontraban en equilibrio ( $p > 0.05$ ) tanto entre los pacientes como en el grupo control excepto para *TLR9* rs5743836 que se observó en desequilibrio tan solo en el grupo control. Este resultado sugería que la

## RESULTADOS

herencia del mencionado SNP se encontraba en una proporción anormalmente baja entre los individuos del grupo control pacientes, sugiriendo que una posible asociación con la enfermedad.

### 1.2.2. Linkage disequilibrium

Por otro lado, el LD hace referencia a la herencia no aleatoria entre alelos de diferentes *loci* en una determinada población. Entre los factores que pueden influir en la distribución aleatoria o no-aleatoriedad (asociada) entre distintos alelos se encuentran la selección natural, la tasa de mutación, la migración génica, el emparejamiento no aleatorio y el ligamento genético. Éste último hace referencia a la posible herencia no-aleatoria que se observa con frecuencia entre alelos contiguos dado que es probable que 2 genes contiguos no se separen durante la recombinación genética de la meiosis y, así, se hereden de manera contigua. Por ello, es de especial importancia determinar el LD entre alelos o SNPs contiguos para establecer en qué grado estos alelos se heredan de forma conjunta. En este sentido, el análisis mostró un gran LD entre los SNPs de *TLR3*, *TLR4* y *TLR9* (**Figura 18**).



**Figura 18.** Diagrama del análisis de Linkage disequilibrium de los SNPs de *TLR3*, *TLR4* y *TLR9*. Abreviaturas: TLR = receptor *toll-like*; Chr = cromosoma; E = exon. Los valores  $D'$  están expresados en % e los cuadrados rojos. Los valores  $R^2$  para TLR3 rs3775296 y rs3775291 = 0.2739, para TLR4 rs4986790 and rs4986791 = 0.923, para TLR9 rs187048 y rs5743836 = 0.2975; para rs187048 y rs352140 = 0.6603; para rs5743836 y rs352140 = 0.2873.

### 1.3. TLR9 rs5743836 como factor genético de susceptibilidad en la Psoriasis

En segundo lugar, se investigó una posible asociación entre los polimorfismos de *TLRs* y la Psoriasis comparando las frecuencias alélicas de todos los SNPs analizados entre pacientes con Psoriasis y controles. El análisis mostró diferencias significativas para *TLR9* rs5743836. En concreto, el genotipo homocigoto CC era más frecuente entre los pacientes que en el grupo control (2.3% vs 0%;  $p=0.0278$ ). Este hallazgo, acorde con el resultado observado en el análisis HWE, establece una posible asociación entre el genotipo CC y la enfermedad (**Tabla 4**).

### 1.4. Polimorfismos genéticos de *TLRs* como factores modificadores de la Psoriasis.

En tercer lugar, se investigó la posibilidad que alguno de los polimorfismos estudiados pudiera actuar como factor genético modificador de la enfermedad, en concreto en relación a la gravedad, precocidad y riesgo de enfermedad articular. Para ello, se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs de *TLRs* analizados entre la cohorte de pacientes y el grupo control. En cuanto a la gravedad de la Psoriasis, el análisis mostró que el alelo A y el genotipo AA de *TLR2* rs5743708 mostraba una tendencia a una mayor gravedad de la enfermedad sin alcanzar significancia estadística ( $p=0.0874$  and  $p=0.0891$ , respectivamente). El genotipo heterocigoto de *TLR7* rs179008 sí mostró una asociación estadísticamente significativa para una mayor gravedad de la enfermedad; sin embargo, esta significancia se perdió en el análisis multivariante. Ningún otro alelo, genotipo o haplotipo mostró relación alguna con la gravedad de la enfermedad.

En cuanto a la APs, el alelo T y el genotipo combinado AT+TT de *TLR7* rs179008 sí mostró una asociación significativa tanto en el análisis univariante como en el multivariante ( $p=0.0121$  and  $p=0.0344$ , respectivamente), siendo este último ajustado por el sexo, la edad al diagnóstico, la duración de la enfermedad, los antecedentes familiares y los valores PASI (**Tabla 5**).

## RESULTADOS

**Tabla 4.** Frecuencia de los genotipos de los SNPs de *TLRs* en pacientes y controles y valores *p* para el análisis HWE.

Gen	SNP	Genotipo	Psoriasis (n = 304)			Controles (n = 305)			$\chi^2$ <i>p</i>
			n	%	HWE <i>p</i>	n	%	HWE <i>p</i>	
<b><i>TLR2*</i></b>	<b>rs121917864</b>	CC	303	100	1	303	100	1	1
		AA	298	0.98	1	302	0.99	1	0.1008
	AG	5	0.02		1	0.01			
	GG	0	0		0	0			
<b><i>TLR3</i></b>	<b>rs3775291</b>	CC	146	0.48	0.50	140	0.47	0.68	0.9650
		TC	134	0.44		130	0.44		
		TT	25	0.08		26	0.09		
	<b>rs3775296</b>	CC	192	0.66	0.29	205	0.67	0.70	0.3984
		CA	84	0.29		89	0.29		
		AA	16	0.05		11	0.04		
<b><i>TLR4</i></b>	<b>rs4986790</b>	AA	259	0.85	0.65	261	0.86	0.39	0.2968
		AG	45	0.15		39	0.13		
		AA	0	0		2	0.01		
	<b>rs4986791</b>	CC	260	0.86	1	261	0.86	0.38	0.5527
		CT	44	0.14		40	0.13		
		TT	0	0		1	0.01		
<b><i>TLR5</i></b>	<b>rs5744168</b>	CC	275	0.92	1	281	0.92	0.33	0.5236
		CT	20	0.07		24	0.08		
		TT	1	0.01		0	0		
<b><i>TLR7**</i></b>	<b>rs179008</b>	AA	212	0.72	0.47	225	0.74	0.52	0.8695
		AT	44	0.15		42	0.14		
		TT	39	0.13		38	0.12		
<b><i>TLR9</i></b>	<b>rs352140</b>	GG	71	0.24	0.73	78	0.26	0.49	0.8715
		GA	146	0.49		146	0.48		
		AA	79	0.27		78	0.26		
	<b>rs5743836</b>	TT	224	0.74	0.64	232	0.77	<b>0.02</b>	<b>0.0278</b>
		TC	72	0.24		70	0.23		
		CC	7	0.02		0	0		
	<b>rs187084</b>	TT	116	0.39	0.71	110	0.37	0.55	0.3965
		TC	146	0.48		140	0.46		
		CC	40	0.13		52	0.17		

\* No se observó ninguna heterogeneidad genética en el SNP *TLR2* rs121917864. \*\* Gen ligado al X. Abreviaturas: SNP = *Single nucleotide polymorphism*; *TLR* = receptor *toll-like*; HWE = Equilibrio Hardy-Weinberg.

**Tabla 5.** Distribución de los polimorfismos de *TLR7* según la presencia o ausencia de artritis psoriásica en pacientes con Psoriasis.

Gen SNP ID	Genotipo	Sin APs (n =164)		APs (n =117)		Univariante		Multivariante*	
		n	%	n	%	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
<i>TLR7</i> rs179008	AA	183	73	28	62	1	-	1	-
	AT	37	15	7	16	1.236 (0.502-3.043)	0.6440	2.452 (0.768-7.651)	0.1223
	TT	29	12	10	22	2.254 (0.991-5.125)	0.0525	2.234 (0.828-6.027)	0.1125
	AT + TT	66	27	17	38	1.683 (0.866-3.274)	0.1248	<b>2.324 (1.064-5.075)</b>	<b>0.0344</b>
	A	403	81	63	70	1	-	-	-
	T	95	19	27	30	<b>1.818 (1.099-3.007)</b>	<b>0.0199</b>	<b>2.109 (1.178-3.777)</b>	<b>0.0121</b>

\*Los parámetros ajustados incluyen sexo, edad del debut de la enfermedad, duración de la enfermedad, historia familiar y valor PASI. Abreviaturas: TLR = receptores *toll-like*; SNP = *single nucleotide polymorphism*; APs = artritis psoriásica; OR = Odds ratio; CI = Intervalo de confianza.

Finalmente, se estudió la posible influencia de los polimorfismos de *TLRs* en la edad de debut de la enfermedad. En este análisis se observaron múltiples asociaciones estadísticamente significativas. El análisis de genotipos combinados del polimorfismo *TLR3* rs3775291 mostró un efecto dominante en la edad de debut de la enfermedad, favoreciendo su precocidad (**Tabla 6**). Además, los genotipos heterocigotos de ambos polimorfismos de *TLR9* rs187084 y rs352140 se asociaron a un debut precoz de la enfermedad ( $p=0.0067$  y  $p=0.0346$ , respectivamente) (**Tabla 6**). Pese al intenso LD entre los SNPs de *TLR9*, el análisis de haplotipos no mostró ningún resultado relevante (datos no presentados).

## RESULTADOS

**Tabla 6.** Distribución de los genotipos de *TLR3* y *TLR9* en relación al debut precoz o tardío de la enfermedad en pacientes con Psoriasis.

Gen SNP ID	Genotipo	Debut precoz (n =164)		Debut tardío (n =117)		Univariante		Multivariante*	
		n	%	n	%	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
<b><i>TLR3</i></b> <b>rs377529</b> <b>1</b>	CC	83	43	49	60	1	-	1	-
	CT	90	47	28	35	<b>0.527 (0.303-0.915)</b>	<b>0.0229</b>	0.566 (0.316-1.013)	0.0552
	TT	20	10	4	5	0.339 (0.109-1.049)	0.0605	<b>0.307 (0.095-0.994)</b>	<b>0.0488</b>
	CT+TT	110	57	32	40	<b>0.493 (0.290-0.836)</b>	<b>0.0087</b>	<b>0.514 (0.294-0.898)</b>	<b>0.0194</b>
	C	256	66	126	78	1	-	1	-
	T	130	34	36	22	<b>0.563 (0.367-0.862)</b>	<b>0.0082</b>	<b>0.564 (0.361-0.883)</b>	<b>0.0122</b>
<b><i>TLR9</i></b> <b>rs187084</b>	TT	69	35	40	50	1	-	1	<b>1</b>
	TC	105	53	31	38	<b>0.509 (0.291-0.891)</b>	<b>0.0180</b>	<b>0.433 (0.237-0.794)</b>	<b>0.0067</b>
	CC	25	12	10	12	0.690 (0.301-1.583)	0.3810	0.697 (0.294-1.652)	0.4120
	TC+CC	130	65	41	51	<b>0.544 (0.322-0.919)</b>	<b>0.0229</b>	<b>0.438 (0.275-0.849)</b>	<b>0.0115</b>
	T	243	61	111	69	1	-	1	-
	C	155	39	51	31	0.749 (0.510-1.099)	0.1397	0.753 (0.491-1.101)	0.1357
<b><i>TLR9</i></b> <b>rs352140</b>	GG	41	21	25	31	1	-	1	<b>1</b>
	GA	100	52	34	43	0.558 (0.297-1.048)	0.0698	<b>0.477 (0.240-0.948)</b>	<b>0.0346</b>
	AA	52	27	21	26	0.662 (0.326-1.347)	0.2553	0.502 (0.234-1.077)	0.0767
	GA+AA	152	79	55	69	0.593 (0.331-1.065)	0.0805	<b>0.423 (0.213-0.841)</b>	<b>0.0141</b>
	G	182	47	84	52	1	1	1	-
	A	204	53	76	48	0.799 (0.522-1.155)	0.2330	0.697 (0.470-1.032)	0.0713

\* Entre los parámetros ajustados se incluyen el sexo, los antecedentes familiares y la APs. Abreviaturas: Cr = cromosoma; TLR = receptor *toll-like*; SNP = *single nucleotide polymorphism*; OR = Odds ratio; CI = intervalo de confianza.

## 2. Polimorfismos de los *TLRs* y respuesta al tratamiento con UVBnb en Psoriasis

Un subgrupo de pacientes con Psoriasis incluidos en el anterior estudio fue sujeto de otro subanálisis dadas sus peculiares características. Estos pacientes, reclutados en el Hospital Parc Taulí de Sabadell por el Dr. Romaní, habían sido todos tratados con fototerapia (modalidad UVBnb) y estaban muy bien caracterizados tanto por la descripción de sus variables clínicas (incluyendo variables asociadas al síndrome metabólico) como las relacionadas con la respuesta al tratamiento. Ello, nos animó a explorar en este subgrupo de pacientes una posible influencia de los polimorfismos de *TLRs* analizados en la respuesta a fototerapia.

En este subgrupo de pacientes se incluyeron 23 varones y 19 mujeres de edad media  $46.64 \pm 14.4$  años y mayoritariamente de fototipo III. La edad media de debut de la enfermedad era  $33 \pm 13.4$  años y el 50% de los pacientes presentaban antecedentes familiares. Ninguno de ellos presentaba APs y todos ellos cumplían criterios para el tratamiento con fototerapia UVBnb. El PASI inicial de los pacientes era  $15.4 \pm 5.5$  y el índice de masa corporal de  $27.76 \pm 5.05$ . Según los criterios de la *International Diabetes Foundation* el 58.97% de los pacientes presentaban un síndrome metabólico.

El tratamiento con UVBnb fue muy eficaz, con una reducción media del PASI  $79.70 \pm 15\%$  y un PASI final de  $3.21 \pm 2.75$ . Los pacientes completaron una media de 27 sesiones de tratamiento con una dosis acumulada de  $24.84 \pm 7.07$  J/cm<sup>2</sup>. No se registraron efectos secundarios significativos y no existió ninguna pérdida a lo largo del tratamiento ni el seguimiento realizado con posterioridad. El periodo medio libre de recidiva, definido como el mantenimiento de un PASI <10 o la necesidad de un tratamiento sistémico fue de prácticamente 11 meses.

En la **tabla 2** (ver sección *Introducción 2.7*) se recogen los 8 SNPs de *TLR* 2, 4, 5 y 9 analizados. En cuanto al estudio de los polimorfismos analizados en función de las variables clínicas y respuesta terapéutica, tan solo *TLR9* rs187084 mostró una asociación estadísticamente significativa con una mejor respuesta al tratamiento, de

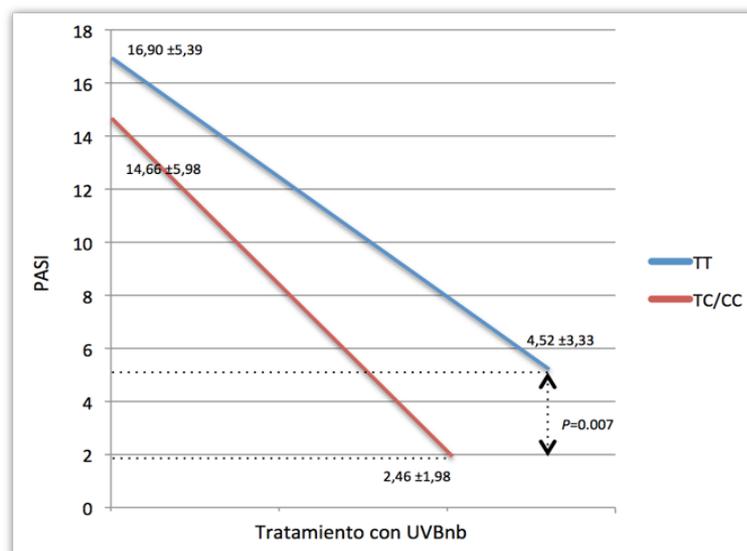
## RESULTADOS

modo que los pacientes portadores de la variante C presentaban un menor PASI final, una mayor reducción % del PASI y un mayor periodo de remisión tras el tratamiento (ver **tabla 7**). Estos pacientes además mostraron un menor requerimiento de sesiones de fototerapia y dosis acumulada, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados se ilustran en la **figura 19** y se confirmaron en el análisis multivariante que se ajustó con la variable sexo y fototipo, identificadas como posibles factores de confusión en el análisis univariante inicial (ver **tabla 8**).

**Tabla 7.** Parámetros clínicos y de respuesta al tratamiento analizados en función al genotipo aislado y agrupado de TLR9 rs187084.

Características	TT	TC/CC	TC	CC	<i>p</i> value
n	13	26	23	3	
Edad (años)	42.2 ±14.4	48.4 ±18.6	46.7 ±17.6	65 ±22.5	0.12
Varón/mujer	8/5	15/11	14/9	1/2	0.66
PASI basal	16.9 ±5.4	14.7 ±5.6	14.9 ±5.9	12.6 ±1.5	0.39
PASI final	4.52 ±3.3	2.5 ±2.0	2.6 ±2.0	0.6 ±0.6	<b>0.008</b>
% mejora PASI	70.7 ±17.1	84.2 ±11.9	82.7 ±11.8	95.4 ±4.3	<b>0.007</b>
Periodo de remisión	6.6 ±6.4	12.76 ±13.7	13.4 ±13.7	11.3 ±4.0	<b>0.04</b>

Los resultados se expresan en media ±desviación estándar. Abreviaturas: PASI = *Psoriasis Area and Severity Index*



**Figura 19.** Respuesta al tratamiento con UVBnb en función de los genotipos agrupados de TLR9 rs187840. La gráfica muestra como los pacientes portadores de al menos un alelo C (genotipo agrupado TC/CC) presentaron una mayor reducción del PASI, un menor valor PASI final y, aunque no estadísticamente significativo, un menor requerimiento de número de sesiones para su tratamiento. Abreviaturas: PASI = *Psoriasis Area and Severity Index*.

**Tabla 8.** Análisis univariante y multivariante (regresión lineal) de la mejora % del PASI en función del genotipo TLR9 rs187084 (TT vs TC/CC), sexo, edad, BMI, fototipo, PASI basal, edad de debut de la Psoriasis y periodo de remisión tras UVBnb.

Variables	Análisis univariante		Análisis multivariante	
	Coefficiente ± error típico	p	Coefficiente ± error típico	p
TLR9 rs187084 (TT vs TC/CC)	12.15 ± 3.63	<b>0.002</b>	11.50 ± 3.98	<b>0.005</b>
Edad	0.06 ± 0.14	0.66	-	-
Sexo	6.26 ± 4.84	0.20	4.78 ± 4.44	0.29
BMI	0.44 ± 0.48	0.36	-	-
Fototipo	-5.67 ± 3.99	0.16	-0.67 ± 3.97	0.86
Edad de debut	0.06 ± 0.14	0.66	-	-
PASI basal	-0.30 ± 0.44	0.49	-	-
Periodo de remisión	0.234 ± 0.23	0.31	-	-

Valores expresados en coeficiente no estandarizado ± error típico. Valores ajustados por las variables con un valor  $p < 0.20$  en el análisis de asociación univariante. Abreviaturas: TLR = receptor *toll-like*; PASI = *Psoriasis Area and Severity Index*; BMI = índice de masa corporal.

### **3. Evidencias genéticas y experimentales del papel del receptor linfocítico CD6 en la Psoriasis**

En el momento de diseñar nuestro proyecto de investigación, la eficacia de los anticuerpos monoclonales anti-CD6 en el tratamiento de la Psoriasis era la única evidencia que relacionaba CD6 con la enfermedad. Dado que disponíamos de una extensa cohorte de pacientes con Psoriasis y de un modelo experimental murino de Psoriasis CD6<sup>-/-</sup>, nos dispusimos a estudiar su influencia y, así, aportar nuevas evidencias experimentales y genéticas de su papel en la enfermedad.

#### **3.1. Población a estudio**

La misma cohorte de pacientes con Psoriasis (n =304) y controles (n=305) utilizada para en el proyecto nº 1 de esta tesis doctoral (“**Genetically defined variants of toll-like receptors 3, 7 and 9 as phenotype and risk modifier factors for Psoriasis**”) se utilizó para este estudio, por lo que remitimos al lector a la **tabla 3** y al punto *Discusión 4.1.1.* donde se muestran y se discuten las características clínico-demográficas de la cohorte.

#### **3.2. Estudio genético**

El estudio incluyó el análisis de CD6 y de otros dos genes relacionados, CD5 (receptor hermano de CD6) y ALCAM/CD166 (principal ligando de CD6), para analizar la influencia de CD6 con mayor perspectiva fisiopatológica. La elección de los SNPs a estudio se basó en su impacto funcional e influencia en enfermedades inflamatorias descritas en la literatura existente. El estudio genético incluyó los SNPs de CD6 rs17824933, rs11230563 y rs12360861, los SNPs de CD5 rs2229177, rs2241002 y los SNPs de ALCAM/CD166 rs6437585 y rs579565.

Un primer análisis, mostró que las frecuencias de los SNPs de CD5, CD6 y ALCAM cumplían el principio de HWE ( $p > 0.02$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias entre la cohorte de pacientes y grupo control, descartándose un posible marcador de susceptibilidad para Psoriasis (**Tabla 9**).

**Table 9.** Distribución genotípica de los SNPs de *CD6*, *CD5* y *ALCAM* SNP en pacientes y controles.

Gen	SNP	Genotipo	Casos No. (%)	Controles No. (%)	OR (95% CI)	p
<i>CD6</i>	rs17824933	CC	173 (57.9)	173 (56.7)	1	-
		CG	106 (35.4)	120 (39.4)	0.89 (0.63-1.24)	0.469
		GG	20 (6.7)	12 (3.9)	1.67 (0.79-3.51)	0.180
	rs11230563	CC	98 (34.8)	104 (34.1)	1	-
		CT	127 (45)	144 (47.2)	0.94 (0.65-1.35)	0.722
		TT	57 (20.2)	57 (18.7)	1.06 (0.67-1.68)	0.799
	rs12360861	GG	159 (56.8)	175 (57.8)	1	-
		AG	111 (39.6)	111 (36.6)	0.65 (0.29-1.46)	0.293
		AA	10 (3.6)	17 (5.6)	1.10 (0.78-1.55)	0.580
<i>CD5</i>	rs2229177	CC	65 (21.8)	71 (23.3)	1	-
		CT	139 (46.7)	148 (48.5)	1.03 (0.68-1.54)	0.903
		TT	94 (31.5)	86 (28.2)	1.19 (0.76-1.86)	0.436
	rs2241002	CC	194 (64.5)	194 (63.6)	1	-
		CT	91 (30.2)	101 (33.1)	0.90 (0.64-1.27)	0.555
		TT	16 (5.3)	10 (3.3)	1.60 (0.71-3.61)	0.258
<i>ALCAM</i>	rs6437585	CC	249 (88.9)	261 (86.4)	1	-
		CT	29 (10.4)	40 (13.3)	1.32 (0.79-2.19)	0.289
		TT	2 (0.7)	1 (0.3)	0.48 (0.04-5.29)	0.538
	rs579565	GG	145 (50)	165 (54.5)	1	-
		GA	120 (41.4)	120 (39.6)	1.14 (0.81-1.59)	0.453
		AA	25 (8.6)	18 (5.9)	1.58 (0.83-3.01)	0.165

Abreviaturas : SNP = *single nucleotide polymorphism*; OR = *odds ratio*; CI = intervalo de confianza.

El análisis de LD mostró un gran desequilibrio entre los SNPs de *CD6*, con valores  $D' > 95\%$  y valores  $r$  de -0.47 (para rs17824933 y rs11230563), -0.31 (para rs17824933 y rs12360861) y 0.64 (para rs11230563 y rs12360861), por lo que estos SNPs constituyen un bloque que frecuentemente se hereda conjuntamente. Ello es importante tenerlo presente a la hora de interpretar los resultados en el análisis de haplotipos.

### 3.3. Impacto de CD6 en la gravedad de la Psoriasis

En un segundo análisis, se evaluó la posibilidad que los cualquier polimorfismo analizado tuviera alguna influencia en la gravedad de la Psoriasis. Para ello, se compararon las frecuencias alélicas de los SNPs de *CD5*, *CD6* y *ALCAM/CD166* tanto entre los pacientes que habían recibido o no tratamiento sistémico (categorizados en Psoriasis leve y moderada-grave, respectivamente) como entre pacientes con PASI  $\leq 7$  y PASI  $> 7$  para potenciar el análisis. Dado que existían diferencias estadísticamente significativas en relación a la edad de debut, la presencia de APs y la duración de la enfermedad entre los grupos Psoriasis leve vs moderada-grave, dichas variables se ajustaron en los subsiguientes análisis multivariantes. También se incluyó como variable de confusión el sexo y los valores PASI.

El análisis univariante mostró diferencias estadísticamente significativas asociadas a todos los SNPs de *CD6* analizados, tanto al comparar los grupos Psoriasis leve vs moderada-grave como al comparar los grupos PASI $<7$  vs PASI $>7$ . Sin embargo, solo las asociaciones entre *CD6* rs12360861A con Psoriasis moderada-grave y *CD6* rs17824933G, rs11230563C y rs12360861A y valores PASI $>7$  permanecieron estadísticamente significativas en el análisis multivariante (ver **tabla 10**). Por el contrario, Ninguno de los SNPs de *CD5* y *ALCAM/CD166* analizados mostró asociación alguna con los parámetros de gravedad de la enfermedad.

Los análisis de genotipos aislados y agrupados también mostraron resultados estadísticamente significativos para *CD6* en relación a la Psoriasis moderada-grave a y valores PASI $>7$  (ver **tabla 11**). De nuevo, los mismos análisis para los SNPs de *CD5* y *ALCAM* no mostraron relación alguna.

**Tabla 10.** Distribución alélica de los SNPs de CD6 en pacientes con Psoriasis leve vs moderada-grave y en pacientes con PASI<7 vs PASI >7. Resultados del análisis univariante y multivariante.

SNP	Alelo	Ps leve n (%)	Ps moderada-grave n (%)	OR*	P*
rs17824933	C	182 (80.5)	271 (72.8)	1.44	0.1009
	G	44 (19.5)	101 (27.2)	(0.93-2.21)	
rs11230563	C	110 (51.9)	213 (60.5)	0.68	<b>0.0463</b>
	T	102 (48.1)	139 (39.5)	(0.47-0.99)	
Rs12360861	G	60 (28.6)	70 (20.0)	0.68	0.0811
	A	150 (71.4)	280 (80.0)	(0.44-1.05)	

SNP	Alelo	PASI≤7 n (%)	PASI>7 n (%)	OR*	P*
rs17824933	C	226 (80.7)	227 (71.4)	1.59	<b>0.0284</b>
	G	54 (19.3)	91 (28.6)	(1.05-2.42)	
rs11230563	C	127 (49.2)	196 (64.1)	0.53	<b>0.0010</b>
	T	131 (50.8)	110 (35.9)	(0.37-0.78)	
Rs12360861	G	75 (29.3)	55 (18.1)	0.56	<b>0.0074</b>
	A	181 (70.7)	249 (81.9)	(0.36-0.85)	

\*Análisis multivariante ajustado por edad de debut de la Psoriasis, presencia de APs, sexo y duración de la enfermedad. Abreviaturas: SNP = single nucleotide polymorphism; Ps = Psoriasis; No = número; OR = odds ratio; PASI = *Psoriasis Area and Severity Index*.

## RESULTADOS

**Tabla 11.** Distribución genotípica de los SNPs de CD6 en pacientes con Psoriasis leve vs moderada-grave y en pacientes con PASI<7 vs PASI >7. Resultados del análisis univariante y multivariante.

SNP	Alelo	Ps leve n (%)	Ps moderada-grave n (%)	OR* (95% CI)	P*
rs17824933	CC	76 (67.3)	97 (52.2)	1	-
	CG	30 (26.5)	76 (40.9)	1.78 (1.00-3.18)	<b>0.049</b>
	GG	7 (6.2)	13 (6.9)	1.25 (0.43-3.68)	0.681
	CG+GG	37 (32.7)	89 (47.8)	1.68 (0.98-2.90)	0.061
rs11230563	CC	26 (24.5)	72 (40.9)	1	
	CT	58 (54.7)	69 (39.2)	0.42 (0.22-0.80)	<b>0.008</b>
	TT	22 (20.8)	35 (19.9)	0.60 (0.27-1.32)	0.203
	CT+TT	80 (75.5)	104 (59.1)	0.47 (0.26-0.85)	<b>0.013</b>
rs12360861	GG	51 (48.6)	108 (61.7)	1	
	GA	48 (45.7)	63 (36)	0.42 (0.11-0.64)	0.213
	AA	6 (5.7)	4 (2.3)	0.74 (0.43-1.30)	0.304
	AG+AA	54 (51.4)	67 (38.2)	0.71 (0.41-1.22)	0.211

SNP	Alelo	PASI≤7 n (%)	PASI>7 n (%)	OR (95% CI)	p
rs17824933	CC	93 (66.4)	80 (50.3)	1	-
	CG	40 (28.6)	66 (41.5)	1.88 (1.07-3.29)	<b>0.028</b>
	GG	7 (5.0)	13 (8.2)	1.85 (0.63-5.42)	0.262
	CG+GG	47 (33.6)	79 (49.7)	1.87 (1.10-3-20)	<b>0.022</b>
rs11230563	CC	30 (23.3)	68 (44.5)	1	-
	CT	67 (51.9)	60 (39.2)	0.42 (0.23-0.78)	<b>0.006</b>
	TT	32 (24.8)	25 (16.3)	0.34 (0.16-0.74)	<b>0.007</b>
	CT+TT	99 (67.7)	85 (55.6)	0.40 (0.22-0.71)	<b>0.002</b>
rs12360861	GG	60 (46.9)	99 (65.1)	1	-
	GA	60 (46.9)	51 (33.6)	0.22 (0.04-1.13)	0.069
	AA	8 (6.2)	2 (1.3)	0.56 (0.32-0.97)	<b>0.038</b>
	AG+AA	68 (53.1)	53 (34.9)	0.52 (0.30-0.89)	<b>0.002</b>

\*Análisis multivariante ajustado por edad de debut de la Psoriasis, presencia de APs, sexo y duración de la enfermedad. Abreviaturas: SNP = single nucleotide polymorphism; Ps = Psoriasis; OR = odds ratio; PASI = *Psoriasis Area and Severity Index*.

El análisis de haplotipos mostró que 4 haplotipos justificaban el 99.6% de los identificados en la cohorte de pacientes con Psoriasis. Las combinaciones haplotípicas que mostraron asociaciones estadísticamente significativas con valores PASI>7 se muestran en la **tabla 12**.

**Tabla 12.** Distribución haplotípica de los SNPs de CD6 en pacientes con Psoriasis leve vs moderada-grave (parte superior tabla) y en pacientes con PASI<7 vs PASI >7 (parte inferior tabla). Resultados del análisis univariante y multivariante.

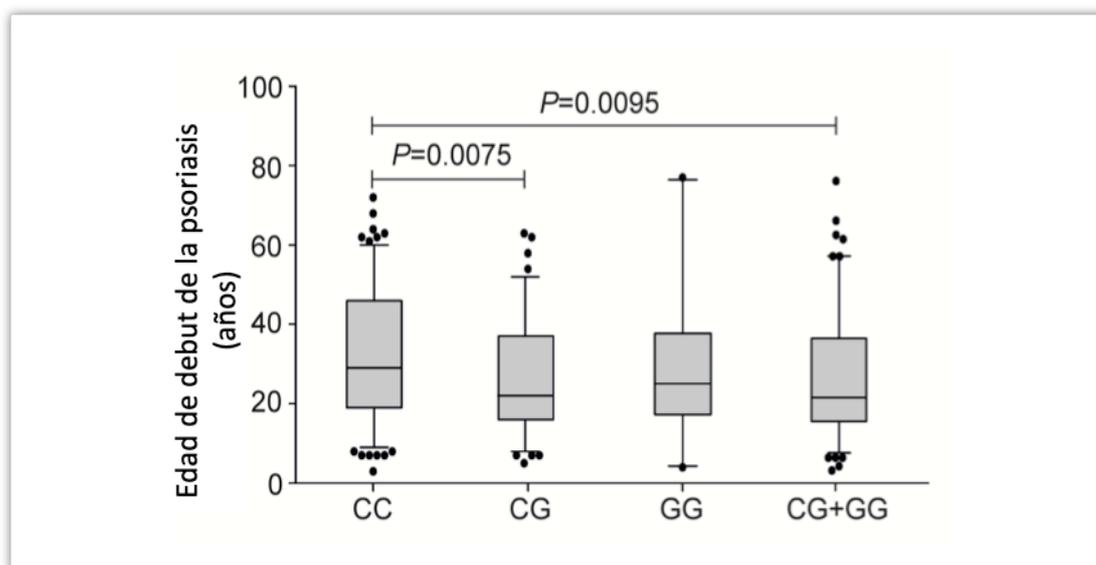
rs17824933	rs11230563	rs11230563	%	OR*	p*
C	C	G	33.0	1	-
G	C	G	24.2	1.12 (0.68-1.84)	0.660
C	T	A	23.6	0.62 (0.36-1.05)	0.074
C	T	G	19.2	0.77 (0.45-1.31)	0.330
C	C	G	32.5	1	-
G	C	G	24.6	0.01 (-0.16 a 0.17)	0.930
C	T	A	23.9	-0.2 (-0.37 a 0.02)	<b>0.033</b>
C	T	G	19.0	-0.27 (-0.45 a 0.09)	<b>0.003</b>

\*Análisis multivariante ajustado por edad de debut de la Psoriasis, presencia de APs, sexo y duración de la enfermedad. Abreviaturas: Ps = Psoriasis; OR = odds ratio.

En conclusión, estos datos sugieren que CD6 representa un marcador genético modificador de la gravedad de la enfermedad. Dado el importante LD que existe entre los tres SNPs analizados, y estudiando los resultados de los distintos análisis de asociación, parece probable que sea rs11230563 el que confiera un mayor riesgo a padecer una enfermedad más grave (SNP más intensa y frecuentemente asociado a la gravedad de la Psoriasis).

### 3.4. Impacto de CD6 en la edad de debut de la Psoriasis

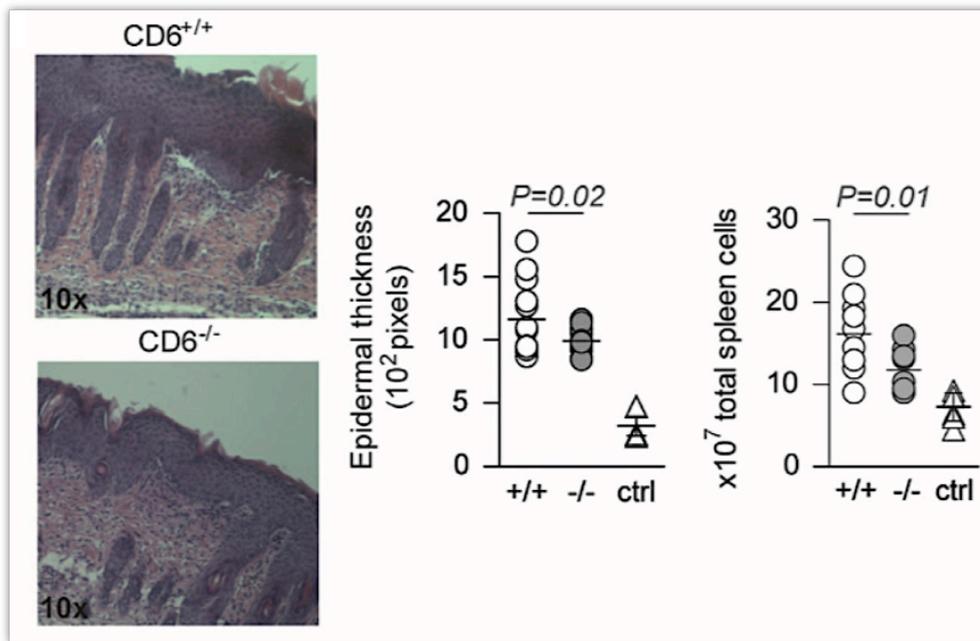
Finalmente, se realizó un análisis de asociación entre los SNPs de CD6 y la edad de debut de la enfermedad, frecuentemente asociada a una enfermedad más grave y generalizada. En dicho análisis, se observó una asociación estadísticamente significativa entre la edad de debut de la enfermedad y el polimorfismo CD6 rs17824933 tanto en su genotipo heterocigoto como agrupado, tal y como se muestra en la **figura 20**.



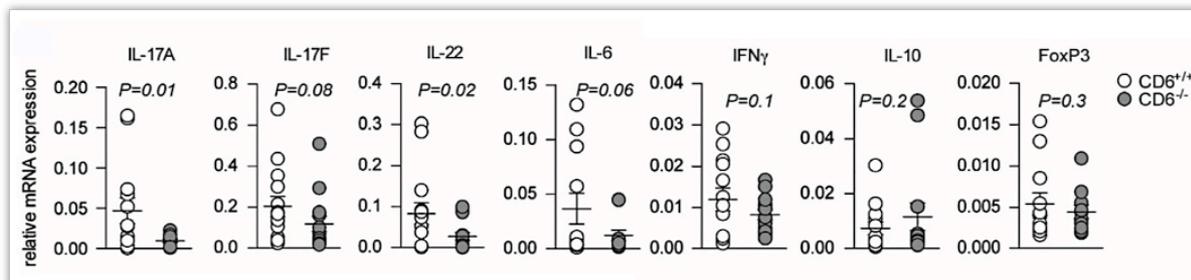
**Figura 20.** Whisker's plots que muestran la asociación entre la edad de inicio de la Psoriasis y los genotipos de *CD6* rs17824933, aislados (izquierda) y agrupados (derecha). La línea horizontal en el medio de cada cuadro indica la mediana, mientras que los bordes superior e inferior del cuadro marcan los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los "bigotes" arriba y abajo del cuadro marcan los percentiles 90 y 10. Los puntos fuera de los "bigotes" son valores atípicos más allá del percentil 90 o 10. Los valores *p* se obtuvieron de la prueba U de Mann-Whitney.

### 3.5. Estudio experimental sobre el papel de CD6 en un modelo murino de Psoriasis inducido por IMQ

El posible papel de CD6 en la formación de la placa de Psoriasis se investigó en un modelo experimental bien caracterizado de Psoriasis inducido por IMQ<sup>395</sup> en ratones CD6<sup>+/+</sup> y CD6<sup>-/-</sup>. Tal y como se muestra la **figura 21**, los ratones CD6<sup>-/-</sup> mostraron un menor engrosamiento de la epidermis así como una menor expresión de mRNA de distintas citoquinas relacionadas, incluyendo IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-6 e INF $\gamma$ , sin afectar aparentemente la expresión de, IL-10 y FoxP3 (**Figura 22**). Destacar que tan solo se observaron diferencias estadísticamente significativas para IL-17A e IL-22, por lo que en este modelo experimental CD6 mostró un efecto relativamente específico sobre la vía Th17. Además, estos ratones mostraron una menor esplenomegalia inducida por IMQ por lo que se deduce que desarrollaron una menor respuesta inflamatoria.



**Figura 21.** Los ratones CD6<sup>-/-</sup> mostraron un fenotipo atenuado de Psoriasis inducida por IMQ ilustrado por la menor infiltración y grosor de la epidermis así como una menor recuento total de células esplénicas.



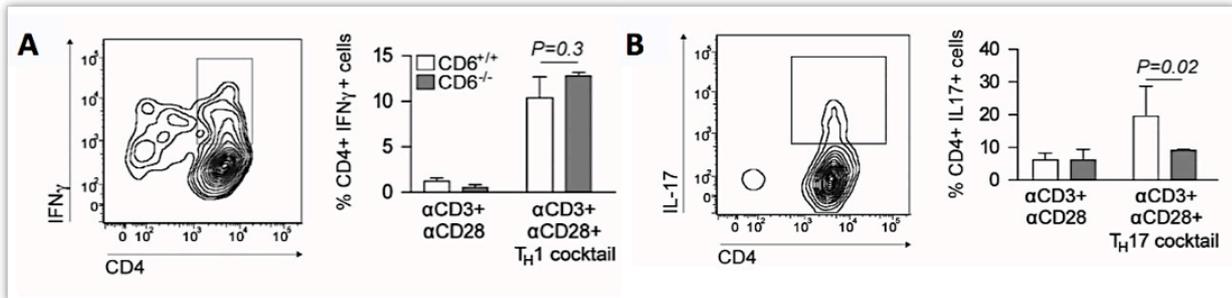
**Figura 22.** Estudio cuantitativo de la expresión de mRNA de IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-6, IFN $\gamma$ , IL-10 y FoxP3 en biopsias cutáneas de ratones CD6<sup>-/-</sup> y CD6<sup>+/+</sup> tras 7 días de estimulación con IMQ. Los valores *p* se muestran en la parte superior de la gráfica correspondiente.

### 3.6. Estudio *in vitro* de la influencia de CD6 en la polarización de células T naïve

Para profundizar en el mecanismo por el que los ratones CD6<sup>-/-</sup> mostraban un fenotipo atenuado de Psoriasis y una menor expresión de ILs Th17, se procedió a analizar la influencia de CD6 en la polarización de las células T. Para ello, se aislaron células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup> y se cultivaron bajo condiciones optimas para su diferenciación en Th1 y Th17. El análisis mediante citometría de flujo no mostró diferencias en el % de células T CD4<sup>+</sup>INF $\gamma$ <sup>+</sup> entre células procedentes de ratones CD6<sup>-/-</sup> y CD6<sup>+/+</sup>. Sin embargo, de nuevo se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando las células T se

## RESULTADOS

cultivaron bajo condiciones óptimas para la polarización Th17. En efecto, el % de células T  $CD4^+IL-17^+$  en ratones  $CD6^{-/-}$  fue claramente inferior al observado en ratones  $CD6^{+/+}$  mostrando una influencia estirpe-específica de este receptor en la diferenciación Th17 no observada en Th1 (**Figura 23**).



**Figura 23.** A) Diagrama de contorno representativo que muestra la estrategia para detectar células activadas Th1 *in vitro* y porcentajes (media  $\pm$  error estándar.) de células  $CD4^+IFN\gamma^+$  tras la estimulación de células T naïve  $CD6^{-/-}$  y  $CD6^{+/+}$  en condiciones de polarización Th1 y no polarizadoras. B) Los mismos análisis que en A) para la polarización Th17. Los análisis estadísticos se realizaron mediante pruebas *t* paramétricas para datos no apareados (nivel de significación establecido en  $p < 0.05$ ).

Estos resultados son coherentes con los observados en el modelo experimental de Psoriasis inducido por IMQ y otorgan un papel fundamental al receptor linfocítico CD6 en la diferenciación linfocitaria a Th17, aparentemente estirpe-específica, y en el desarrollo de la enfermedad.

#### 4. Polimorfismos de los *FcRγ* en el tratamiento biológico de la Psoriasis

En el momento en que se diseñó este proyecto (año 2007), no existía ningún factor clínico, analítico ni genético que permitiera pronosticar la respuesta al tratamiento biológico en Psoriasis. Sí existían importantes trabajos sobre los polimorfismos de *FcγRs* y la respuesta terapéutica a rituximab en el linfoma no Hodgkin,<sup>368</sup> y otros estudios en patología inflamatoria (EC<sup>316</sup> y artritis inflamatoria<sup>360,383</sup>) sobre la respuesta al tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$  en artritis inflamatoria. La farmacodinámica y la farmacocinética de los agentes biológicos y los anteriormente mencionados estudios inspiraron el proyecto de investigación nº 4 que se presenta en esta tesis doctoral.

##### 4.1. Población a estudio

La **tabla 13** muestra las características de la población a estudio. Se incluyó un total de 70 pacientes con Psoriasis moderada-grave procedentes de 2 centros hospitalarios de III nivel del área metropolitana de Barcelona. Todos ellos recibieron tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$  al menos durante 12 semanas que duró el seguimiento. El 74.3% de los pacientes eran varones, la edad media de la cohorte 45.8 años y el tiempo de evolución medio de la enfermedad 17.4 años. El fármaco anti-TNF más empleado fue etanercept (54.4%), en segundo lugar adalimumab (25% ) y finalmente infliximab (20.6%) reflejando la tendencia general en el uso de los agentes biológicos anti-TNF $\alpha$  en el período del estudio 2007-2010.

En global, la respuesta al tratamiento biológico fue notable, alcanzando un índice PASI 75 (reducción de >75% del valor inicial del PASI) a las 12 semanas de tratamiento en el 71.4% de los pacientes. El fármaco anti-TNF $\alpha$  más eficaz tras 12 semanas de tratamiento fue infliximab (PASI 75 = 93%), seguido de adalimumab (PASI 75% = 76%) y por últimos etanercept (PASI 75% = 67%). Estos resultados son congruentes con los ensayos clínicos desarrollados en Psoriasis si bien nuestra cohorte mostró una sensible mejor respuesta para cada uno de los fármacos en cuestión.<sup>94,96,97</sup> Tan solo el 8.6% de los pacientes no alcanzaron una respuesta PASI50 por lo que se consideraron fracasos terapéuticos.

## RESULTADOS

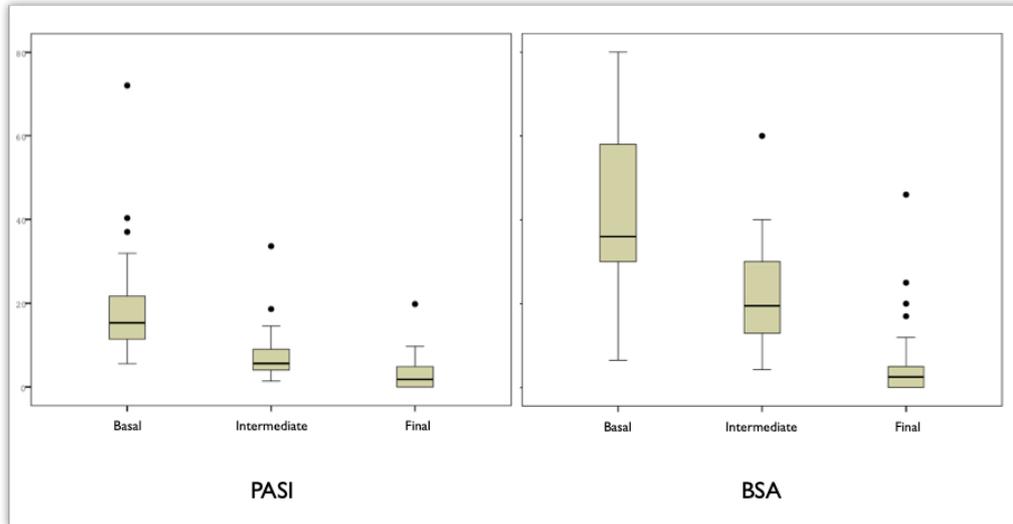
**Tabla 13.** Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con Psoriasis moderada-grave incluidos e la población a estudio. Respuesta PASI75 y PASI50 a las 12 semanas de tratamiento.

	<i>Pacientes (n = 70)</i>	<i>Rango</i>	
<i>Sexo</i>			
Varones (%)	52 (74.3 %)		
Mujeres (%)	18 (25.7 %)		
<i>Edad* (SD)</i>	45.8 (12.7)	22-80	
<i>Edad debut Psoriasis (SD)</i>	26.2 (13.7)	7-62	
<i>Duración enfermedad* (SD)</i>	17.4 (8.3)	3-37	
<i>PASI basal (SD)</i>	17.7 (11.1)		
<i>BSA basal (SD)</i>	35.6 (19.4)		
<i>Fármaco anti-TNF-<math>\alpha</math></i>		<b>PASI 75<sub>sem12</sub></b>	<b>PASI &lt;50<sub>sem12</sub></b>
Etanercept	38 (54.3 %)	26 (68.4 %)	4 (10.5 %)
Adalimumab	18 (25.7 %)	14 (77.8 %)	2 (11.1 %)
Infliximab	14 (20 %)	13 (92.9 %)	0 (0 %)
<b>Total</b>	70 (100 %)	53 (75.7 %)	6 (8.6 %)

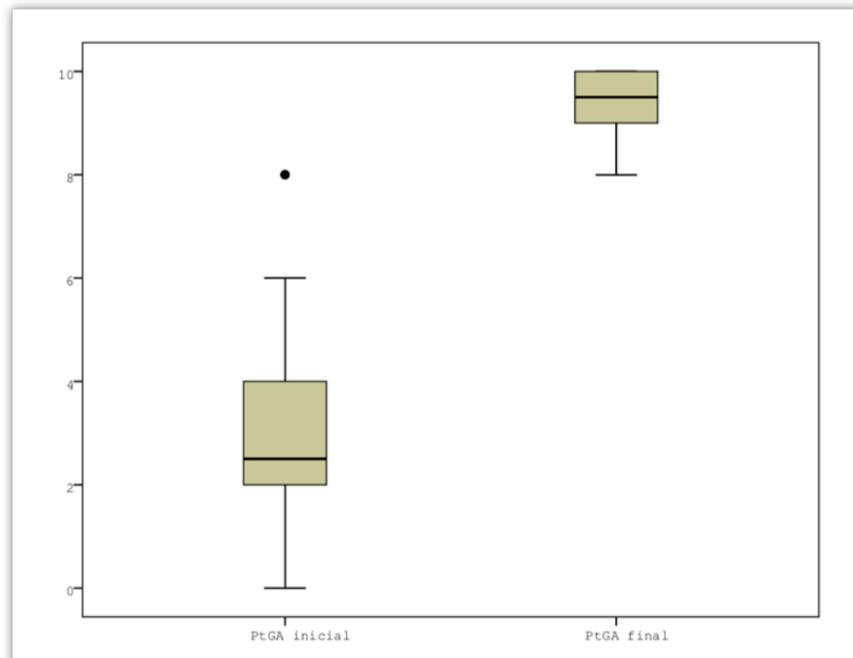
\* expresado en años. Abreviaturas: SD = desviación estándar; PASI = *Psoriasis Area and Severity Index*; BSA = área corporal afectada; sem = semana.

La respuesta al tratamiento biológico anti-TNF- $\alpha$  se valoró mediante las variables PASI y BSA en la semana 0 (PASI<sub>inicial</sub>), semana 6 u 8 (PASI<sub>intermedio</sub>) y semana 12 (PASI<sub>final</sub>). La **figura 24** muestra la evolución de los valores PASI y BSA a lo largo del seguimiento. Como se puede observar, las gráficas muestran una importante reducción de ambas variables que clínicamente se traduce en una menor extensión, infiltración, eritema y descamación de la Psoriasis (PASI) y una menor superficie afectada (BSA). Además, se incluyó como medida subjetiva al estado de la enfermedad, una valoración realizada por parte del paciente (PtGA de *Patient Global Assessment*) en la que 0 era la peor y 10 la mejor de las situaciones en relación al tratamiento y la enfermedad. Esta medida pretendía valorar la satisfacción de los pacientes con el tratamiento (ver **Figura**

25).



**Figura 24.** Whisker's plots que muestra la evolución de los valores PSA y BSA a lo largo de las 12 semanas de seguimiento.



**Figura 25.** Whisker's plot que muestra la evolución de los valores PtGA definidos por el propio paciente en relación a la satisfacción con el tratamiento.

## RESULTADOS

### 4.2. Estudio genético

Se genotiparon los polimorfismos rs1801274 *FcγRIIA*-H131R y rs396991 *FcγRIIIA*-V158F en los 70 pacientes incluidos en el estudio. La **tabla 14** muestra la distribución de los genotipos agrupados de *FcγRIIA*-H131R y *FcγRIIIA*-V158F según las distintas variables de respuesta.

El análisis univariante entre los genotipos agrupados de *FcγRIIA*-H131R y *FcγRIIIA*-V158F y las distintas variables de respuesta mostró una tendencia a una mejor respuesta en pacientes con genotipos de baja afinidad (RR y FF) en comparación con los de genotipos con alelos de alta afinidad (HR+HH y VF+VV). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros analizados.

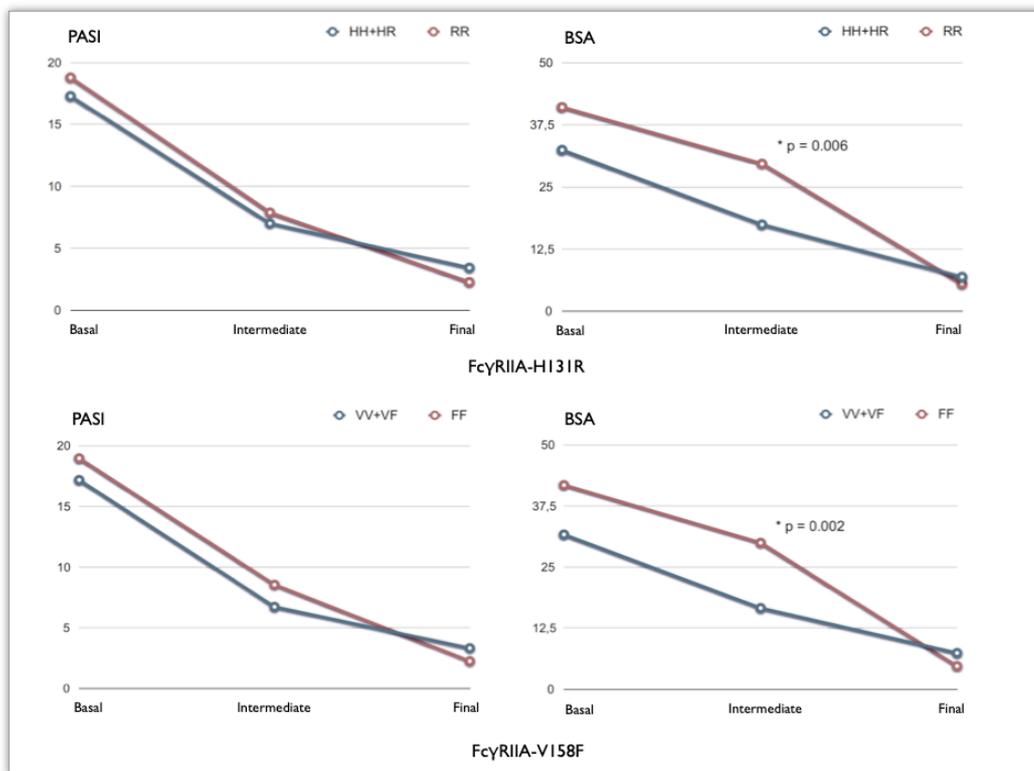
**Tabla 14.** Distribución de los genotipos agrupados en función de las variables respuesta PASI, BSA y PtGA tras 12 semanas de tratamiento biológico anti-TNF- $\alpha$ . Valor p del análisis univariante entre los genotipos agrupados y cada una de las variables respuesta.

	<i>FcγRIIA</i> -H131R		valor p	<i>FcγRIIIA</i> -V158F		Valor p
	HH+HR	RR		VV+VF	FF	
<i>PASI75</i> (%)	70.8	82.4	0.523	69.4	88.9	0.126
<i>Mejora PASI</i> (%)	78.5	86.3	0.194	79.2	86.0	0.250
< <i>PASI50</i> (%)	13	0	0.178	12.5	0	0.327
<i>Mejora BSA</i> (%)	76.5	78.7	0.796	73.8	82.6	0.296
<i>PtGA inicial</i>	3	2.57	0.668	3.09	2.6	0.602
<i>PtGA final</i>	9.23	9.57	0.343	9.2	9.5	0.382

Abreviaturas: PASI = *Psoriasis Area and Severity Index*; BSA = Área corporal afectada; PtGA = Valoración global por parte del paciente.

Del mismo modo, ningún paciente con genotipo de baja afinidad para *RIIA*-H131R y *FcγRIIIA*-V158F presentó una mala respuesta al tratamiento (<PASI50), pero este hecho tampoco fue estadísticamente diferencial respecto a los pacientes con genotipos con alelos de alta afinidad.

La **figura 26** muestra la evolución de los valores medios de PASI y BSA en función de los genotipos agrupados de *FcγRIIA*-H131R y *FcγRIIA*-V158F a lo largo del seguimiento. Si bien no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en relación con la evolución del índice PASI, sí se observó que los pacientes con genotipos con alelos de alta afinidad (HR+HH y VF+VV) presentaban una mayor reducción del BSA en el punto intermedio del seguimiento respecto a los pacientes con genotipos de baja afinidad (RR y FF) tanto para *FcγRIIA*-H131H como para *FcγRIIA*-V158F. Estas diferencias eran estadísticamente significativas en el valor BSA<sub>intermedio</sub> (*FcγRIIA*-H131R: RR=29.9 vs HH+HR=17.4;  $p=0.006$ , y *FcγRIIA*-V158F: FF=30 vs VV+VF=16.6;  $p=0.002$ ) pero no se mantuvieron a lo largo del seguimiento para ninguno de los polimorfismos.

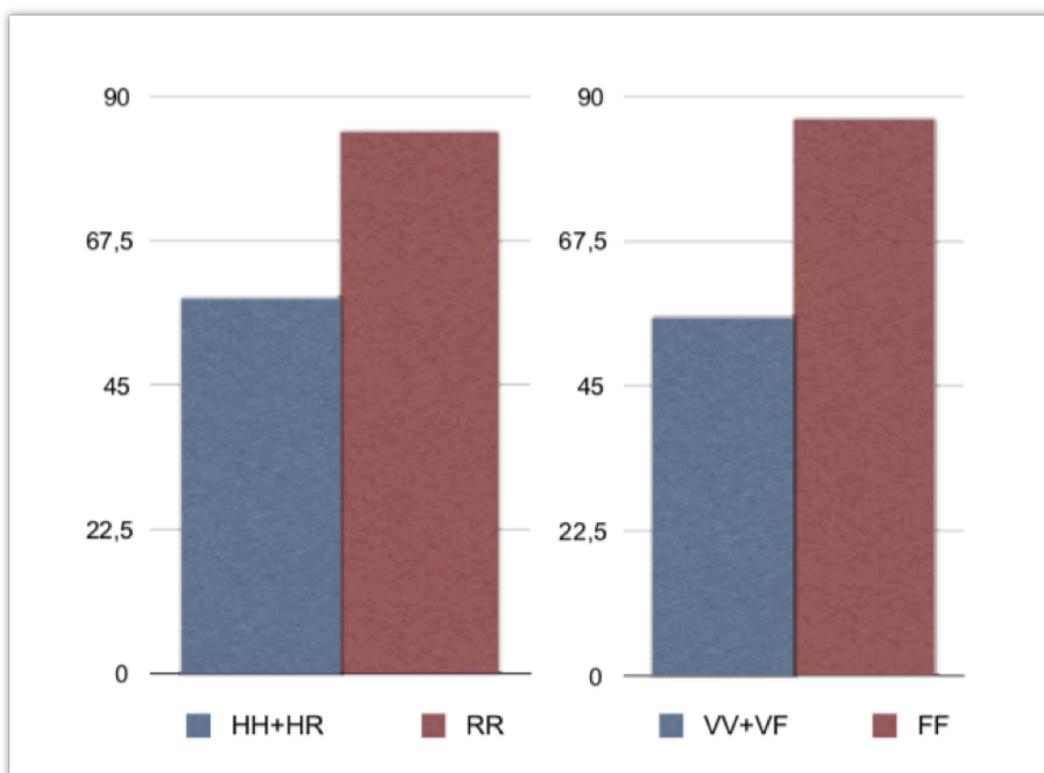


**Figura 26.** Evolución de los valores PASI y BSA según genotipos agrupados (genotipos con alelo de alta afinidad vs genotipo de baja afinidad). Valor  $p$  para diferencias en el valor BSA en función al genotipo agrupado.

De este modo, en ambos polimorfismos, observamos un patrón común de respuesta al tratamiento, en el que los pacientes con alelos de alta afinidad presentan una mayor y más rápida reducción del BSA que se compensa a las 12 semana de seguimiento gracias a una mejor respuesta de los pacientes con genotipo de baja afinidad en el tramo final

## RESULTADOS

del tratamiento. La **figura 27** muestra el % de mejoría del BSA para cada genotipo durante la segunda mitad del tratamiento. Como puede observarse, los pacientes con genotipo de baja afinidad presentaron una mayor reducción del BSA en el segundo periodo de tratamiento. Estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas.



**Figura 27.** Gráfico de barras que muestra el % de mejoría del BSA para los genotipos agrupados en función de la presencia o no de alelos de alta afinidad correspondiente a la segunda mitad del tratamiento (de la semana 6-8 a la semana 12).

El análisis multivariante permitió explorar si la asociación entre los genotipos con alelos de alta afinidad y una más rápida reducción del BSA en las primeras 6-8 semanas de tratamiento era independiente o si, por el contrario, era dependiente de otros factores que pudieran influir en la respuesta al tratamiento. Como variables de confusión se incluyeron el sexo, la edad, la eficacia del fármaco biológico empleado y el valor BSA inicial. Este análisis se realizó para el  $BSA_{intermedio}$ , el  $BSA_{final}$  y el  $PASI_{final}$  (ver **tabla 16**). Los resultados mostraron que la asociación entre los genotipos con alelos de alta afinidad de ambos polimorfismos (HR+RR y VF+VV) y una mayor reducción del  $BSA_{intermedio}$  sí era independiente de la edad, sexo, tratamiento biológico utilizado y

BSA<sub>inicial</sub>. Como era de esperar por los resultados obtenidos en el análisis univariante, no se detectaron diferencias entre los genotipos en relación al BSA<sub>final</sub> y PASI<sub>final</sub> (**Tabla 16**).

**Tabla 16.** Análisis multivariable de regresión lineal en función del BSA intermedio, BSA final y PASI final.

<i>Variable explicativa</i>	<i>BSA intermedio (semanas 6-8)</i>		<i>BSA final (semana 12)</i>		<i>PASI final (semana 12)</i>	
	$\beta$ coefficient	p	$\beta$ coefficient	p	$\beta$ coefficient	p
Fc $\gamma$ RIIA (HR+RR vs. HH) <sup>+</sup>	0,372	0,029*	0,025	0,782	-0,017	0,767
Fc $\gamma$ RIIA (VV+VF vs. FF) <sup>+</sup>	0,425	0,021*	0,012	0,902	-0,025	0,686
Índice de afinidad del haplotipo <sup>+</sup>	-0,391	0,035*	-0,024	0,795	0,004	0,95

<sup>+</sup>Ajustado por sexo, edad, BSA<sub>inicial</sub> y la eficacia del fármaco biológico utilizado (% de la mejoría PASI). BSA<sub>inicial</sub> y % mejoría PASI significativa en todos los modelos. Abreviaturas: BSA = *Body Surface Area*; PASI = *Psoriasis Area and Severity Index*; Fc $\gamma$ R = Fc gamma receptor.

Dada la similitud en el patrón de respuesta por parte de los dos polimorfismos, nos planteamos la posibilidad que ambos ejercieran un efecto sumatorio o sinérgico, condicionando de manera simultánea la respuesta al tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$ . Para ello, diseñamos una nueva variable que expresara la afinidad global del haplotipo Fc $\gamma$ RIIA-H131R/Fc $\gamma$ RIIA-V158F, estableciendo un índice de afinidad en función del número de alelos de alta afinidad del haplotipo (del 0 al 4). El resultado del análisis multivariante muestra como dicho índice presenta una asociación inversa estadísticamente significativa con la mayor reducción del BSA<sub>intermedio</sub>, independientemente al sexo, edad, fármaco utilizado y BSA<sub>inicial</sub>. De ello se concluye que a mayor número de alelos de alta afinidad en el haplotipo, menor puntuación BSA<sub>intermedio</sub> independientemente del sexo, edad, fármaco utilizado y BSA<sub>inicial</sub> (ver **tabla 16**).

## RESULTADOS

Es de destacar que, si bien la asociación entre genotipos con alelos de alta afinidad y mayor reducción BSA era independiente al sexo, edad, fármaco utilizado y  $BSA_{inicial}$ , tanto el fármaco empleado como el  $BSA_{inicial}$  también influían por ellos mismos en la reducción del  $BSA_{intermedio}$ . Ello no es de extrañar ya que fármacos más potentes (p.e. infliximab) presentan respuestas terapéuticas más rápidas, y pacientes con BSA iniciales más elevados, mayores reducciones del BSA con un tratamiento eficaz (ver **tabla 17**).

En definitiva, el análisis de la respuesta al tratamiento biológico en función de los polimorfismos *FcγRIIA*-H131R y *FcγRIIIA*-V158F muestra una mejor respuesta a las 12 semanas de tratamiento y menor fracaso terapéutico en pacientes con genotipo de baja afinidad (RR y FF) en comparación con los pacientes con genotipos con alelos de alta afinidad (HR+HH y VF+VV); sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas. Por otro lado, el estudio cronológico de la respuesta, sí muestra diferencias entre los pacientes con genotipo de baja afinidad y pacientes con genotipos con alelos de alta afinidad; estos últimos, presentan una mayor y más rápida reducción del BSA que, si bien es estadísticamente significativa en el punto intermedio, no se mantiene a lo largo de las 12 semana de seguimiento ya que los pacientes con genotipos de baja afinidad muestran en la segunda mitad del tratamiento una respuesta terapéutica más acentuada. Sorprendentemente, este patrón de respuesta es común para ambos polimorfismos que podrían ejercer su efecto farmacológico en sinergia.

**Tabla 17.** Modelo multivariante de regresión lineal que incluye como variable explicativa los polimorfismos *FcγRIIA*-H131R, *FcγRIIIA*-V158F y el índice de afinidad del haplotipo (número de alelos de alta afinidad presentes en el haplotipo).

<i>Variable explicativa</i>	<i>BSA intermedio</i>	
	<i>Coefficiente β</i>	<i>p value</i>
<b><i>FcγRIIA (HR+RR vs. HH)<sup>+</sup></i></b>	0,372	0,029*
Edad	-0.05	0.67
Sexo	-0.17	0.20
Tratamiento biológico*	0.41	0.01
BSA <sub>inicial</sub>	0.45	0.003
<b><i>FcγRIIIA (VV+VF vs. FF)<sup>+</sup></i></b>	0,425	0,021*
Edad	-0.10	0.47
Sexo	-0.13	0.35
Tratamiento biológico*	0.30	0.048
BSA <sub>inicial</sub>	0.42	0.010
<b><i>Índice afinidad del haplotipo<sup>+</sup></i></b>	-0,391	0,035*
Edad	-0.05	0.7
Sexo	-0.15	0.29
Tratamiento biológico*	0.31	0.047
BSA <sub>inicial</sub>	0.40	0.014

<sup>+</sup>Ajustado por sexo, edad, BSA inicial y la eficacia del fármaco biológico utilizado (% de la mejoría PASI). BSA inicial y % mejoría PASI significativa en todos los modelos. Tratamiento biológico expresado en función de su eficacia (% de mejoría del PASI). Abreviaturas: BSA = *Body Surface Area*; PASI = *Psoriasis Area Severity Index*; FcγR = Fc gamma receptor.



## **DISCUSIÓN**

---



## V. DISCUSIÓN

### 1. Polimorfismos de *TLRs* como factor de susceptibilidad y modificador de la enfermedad psoriásica

Tal y como se ha expuesto en la introducción, los TLRs ejercen un papel clave en la fase de inducción de la inflamación en Psoriasis. Su función podría influir bien en la aparición de la enfermedad (factor de susceptibilidad) bien en la gravedad de sus manifestaciones clínicas (factor modificador). Los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral constituyen, junto a otros tres trabajos publicados en 2016<sup>175,176</sup> y 2017<sup>177</sup>, los primeros en analizar el papel de los polimorfismos de *TLRs* en Psoriasis. Nuestro trabajo incluyó distintos polimorfismos de *TLRs* tanto intracelulares sensibles a ácidos nucleicos (*TLR3*, 7 y 9) como extracelulares sensibles a PAMPs microbianos y DAMPs endógenos (*TLR2* y 4).

*Smith et al.*<sup>175</sup> y *Shi et al.*<sup>176</sup> estudiaron polimorfismos de *TLR2* y *TLR4* observando resultados divergentes. Los primeros autores identificaron el polimorfismo *TLR4* rs4986790 como un gen de susceptibilidad para PV y como factor modificador de la enfermedad, favoreciendo la presencia de APs y el debut precoz de la enfermedad en una amplia cohorte de pacientes ingleses.<sup>175</sup> Los segundos autores observaron una asociación entre *TLR2* rs3804099 y PV en una población del sur de China,<sup>176</sup> sin poder replicar la asociación descrita por *Smith et al.* Ninguno de estos hallazgos pudo ser replicado en nuestra cohorte; quizá las diferencias genéticas entre ambas poblaciones expliquen estos resultados aparentemente contradictorios.

En nuestro trabajo, *TLR9* rs5743836 fue identificado como factor de susceptibilidad de la enfermedad.<sup>396</sup> En concreto, el genotipo CC estaba sobreexpresado en la cohorte de pacientes de Psoriasis y ausente en el grupo control. *TLR9* rs5743836 no fue incluido en el trabajo de *Smith et al.* ni de *Shi et al.*, pero sí fue estudiado por *Zablotna et al.*<sup>177</sup> Estos últimos autores si bien no observaron una asociación de susceptibilidad con Psoriasis, sí lo hicieron como factor modificador favoreciendo formas más graves y

## DISCUSIÓN

precoces de la enfermedad.<sup>177</sup> Aunque estos resultados no son idénticos, ambas observaciones sugieren un papel relevante de TLR9 en la patogenia de la Psoriasis. En un análisis más profundo de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, y teniendo en cuenta que era la ausencia de la forma homocigota CC que rompía el HWE en el grupo control, uno podría deducir que más que su presencia predispone a la enfermedad, es en realidad su ausencia que protege frente a ella. En cualquier caso, este es el primer trabajo en que se señala a *TLR9* rs5743836 como factor de susceptibilidad en Psoriasis.

Por otro lado, también se analizó la asociación entre los distintos SNPs con las características clínicas de la enfermedad con objeto de identificar un posible papel de los *TLRs* como factores modificadores de la enfermedad. En cuanto a la gravedad, tan solo *TLR7* rs179008 mostró una asociación estadísticamente significativa con formas más graves de la enfermedad; sin embargo, dicha asociación desapareció tras la corrección con los factores de confusión en el análisis multivariante. Los SNPs de *TLR2* y *TLR4* mostraron cierta predisposición a una enfermedad grave y más precoz respectivamente, pero nunca de manera estadísticamente significativa.

En relación a la enfermedad articular, la variante alélica T y el genotipo agrupado T+TT de *TLR7* rs179008 se asociaron de manera estadísticamente significativa con la presencia de APs, incluso tras una estricta corrección de factores de confusión. Si bien es conocido que TLR7 desarrolla un papel relevante en la activación de las DCs en la cascada inflamatoria de la Psoriasis, no se ha descrito un papel específico en la fisiopatogenia de la APs. Estos resultados podrían estimular nuevas investigaciones en este campo.

Los resultados más notables de nuestro estudio son la influencia de los polimorfismos de *TLR3* y *TLR9* en la edad de aparición de la enfermedad. En primer lugar, se observó una sólida asociación entre *TLR3* rs3775291 y un debut precoz de la enfermedad tanto en el análisis univariante como en el multivariante, nunca antes descrita. Este polimorfismo provoca un cambio amionoácido (L412>F) cerca de la superficie cóncava del ectodominio que altera las interacciones hidrofóbicas y la glicosilación del

receptor y condiciona una menor actividad inflamatoria.<sup>160</sup> En efecto, pese a que la expresión del receptor es similar entre portadores de la variante y controles, la capacidad de los linfocitos para producir INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  tras su estimulación con PolyI:C es significativamente menor.<sup>397</sup> Además, los fibroblastos también presentan una respuesta alterada con una menor capacidad para producir INF- $\beta$  e INF- $\delta$  tras ser estimulados por Poly I:C, *Cándida* y CMV.<sup>397</sup> *TLR3* rs3775291 ha sido asociado con formas persistentes de Sarcoidosis pulmonar,<sup>398</sup> una mayor susceptibilidad para Candidiasis cutánea e infecciones virales (especialmente por CMV), una menor respuesta inmunológica a vacunas<sup>399</sup> y una mayor predisposición a la autoinmunidad.<sup>397</sup> Quizá, una menor señalización de la presencia de células apoptóticas mediada por *TLR3* podría explicar la mayor predisposición a la autoinmunidad y al debut precoz de la Psoriasis en pacientes genéticamente predispuestos.

En segundo lugar, variantes alélicas de *TLR9* rs187084 y rs352140 se asociaron a un debut precoz de la enfermedad en un patrón de herencia dominante. Cabe destacar que *Zablotna et al.* observaron una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo *TLR9* rs5743836 y una enfermedad más grave y precoz,<sup>177</sup> y que los tres polimorfismos de *TLR9* mencionados comparten una mayor actividad transcripcional de este gen.<sup>165,400-402</sup> Teniendo en cuenta i) el papel de *TLR9* rs5743836 como factor de riesgo para Psoriasis, ii) la relación entre un debut precoz y formas más graves de la enfermedad y iii) la asociación entre *TLR9* rs187084 y rs352140 y un debut precoz de la enfermedad observado en nuestra cohorte de pacientes, estos resultados parecen indicar que una mayor transcripción de *TLR9* favorecería un debut precoz de la enfermedad, una mayor gravedad y, quizá, un mayor riesgo a padecer Psoriasis.

Existen genes que han sido asociados a Psoriasis, especialmente a debut precoz. El alelo *HLA-Cw0602* es el factor genético mejor conocido y ha sido también asociado a una mayor gravedad.<sup>16</sup> Sin embargo, hasta el 30-40% de los pacientes son *HLA-Cw0602* negativos, por lo que otros genes podrían explicar el fenotipo de la enfermedad. De hecho, otros genes como *IL-22*,<sup>403</sup> *ERAPI*,<sup>404</sup> *IL-12B* y *IL-23R*<sup>405</sup> han sido identificados como favorecedores de un debut precoz en Psoriasis. Del mismo modo, los SNPs de *TLR3* y *TLR9* identificados en nuestro estudio podrían actuar como variantes genéticas

## DISCUSIÓN

adicionales en el desarrollo de Psoriasis, favoreciendo un debut precoz de la enfermedad. Los resultados de *Zablotna et al.*<sup>177</sup> apoyan esta hipótesis. No obstante, la confirmación de estos resultados requiere de la replicación en otras poblaciones con mayor número de pacientes y descartar una posible asociación fortuita entre los polimorfismos de *TLR3* y *TLR9* identificados y el factor genético más relevante en Psoriasis, el *HLA-Cw0602*.

En conjunto, los resultados del primer estudio de esta Tesis Doctoral apoyan el concepto que los TLRs sensores de ácidos nucleicos (*TLR3*, *TLR7* y *TLR9*) juegan un papel clave en la fisiopatogenia de la Psoriasis y son clínicamente relevantes. Por un lado, *TLR7* y *TLR9* median la producción de INF tipo I en queratinocitos y pDCs, promoviendo la fase de inducción de la respuesta inflamatoria.<sup>142,406</sup> Por otro lado, *TLR7* y *TLR9* activados por complejos DNA/RNA propios y LL37 estimulan persistentemente a las pDCs y mDCs para iniciar y promover una respuesta inmunitaria adaptativa Th17, rompiendo así, en ambos casos, la tolerancia inmunológica a moléculas propias.<sup>32</sup>

El papel de *TLR3* en Psoriasis no está tan bien definido como el de sus homólogos. Sin embargo, al igual que *TLR7* y *TLR9*, se trata de un TLR intracelular capaz de detectar ácidos nucleicos y producir INF tipo I y, además, está constitutivamente expresado en queratinocitos y en las mDCs.<sup>62,143</sup> Por ello, *TLR3* bien podría contribuir a promover la inflamación en Psoriasis. En nuestro trabajo, no se incluyó ningún polimorfismo de *TLR8*, otro TLR intracelular que guarda gran homología con *TLR7*. Al igual que su receptor hermano, *TLR8* ha sido implicado en la activación de las mDCs por complejos de ácidos nucleicos y LL37<sup>77</sup> y su inhibición mejora la inflamación<sup>407</sup> y la placa de psoriasis.<sup>408</sup> En definitiva, la alteración en la actividad de TLRs intracelulares capaces de reconocer ácidos nucleicos parece influir en la fisiopatogenia de la Psoriasis y modificar tanto el riesgo como el fenotipo de la enfermedad. Por ello, los TLRs intracelulares representan una atractiva diana terapéutica en Psoriasis y es posible que en un futuro próximo, dichos hallazgos puedan plasmarse en un tratamiento eficaz para la enfermedad.<sup>154</sup>

Nuestro estudio presenta varias limitaciones. En primer lugar, el hecho de recibir tratamiento sistémico puede que no sirva para definir correctamente la gravedad de la enfermedad. En la práctica clínica, la gravedad de la Psoriasis se define en función del PASI pero también en base a la refractariedad de la Psoriasis, las localizaciones anatómicas afectadas y el impacto psicológico en el paciente. Todos estos factores si bien contribuyen a plantear un tratamiento sistémico, fototerapia o terapia biológica, responden en realidad a diferentes aspectos inmunológicos y, por ello, los subgrupos de pacientes obtenidos en función a esta clasificación pueden ser inmunológicamente heterogéneos.<sup>409</sup> Sin embargo, esta definición de la gravedad de la Psoriasis ha sido aceptada y utilizada satisfactoriamente en muchos estudios de referencia.<sup>12,410-412</sup> En segundo lugar, el número de individuos incluidos en nuestra cohorte es limitado y por ello, los hallazgos del estudio deben interpretarse con cautela, especialmente si tenemos en consideración que otros estudios más potentes como los GWAS no han encontrado ninguna asociación entre polimorfismos de TLRs y Psoriasis. No obstante, no se puede olvidar que la densidad y la funcionalidad de los SNPs seleccionados en los estudios GWAS son claves para el éxito de los mismos, cosa que se puede obviar en estudios centrados en genes concretos como es el nuestro. Finalmente, señalar que la lista de polimorfismos podría ampliarse e incluir más SNPs y otros *TLRs* relevantes en la fisiopatogenia de la Psoriasis como *TLR8*.<sup>32</sup> Es más, los TLRs son sólo la punta del iceberg, y muchas otras proteínas implicadas en las vías de señalización de los TLR podrán ser determinantes en su actividad.<sup>110,157</sup> Por ello, nuestros resultados deberían animar a los investigadores a realizar estudios más extensos que analizaran con mayor profundidad el papel de los TLRs y sus vías de señalización en Psoriasis.

### **2. Polimorfismos de *TLRs* y respuesta al tratamiento con UVBnb**

En nuestro estudio, observamos que la presencia del alelo variante de *TLR9* rs187840 confiere una mejor respuesta y más sostenida a UVBnb en pacientes con Psoriasis. Hasta la fecha, tan solo el receptor de la vitamina D (*VDR*)<sup>413</sup> ha sido relacionado con la respuesta a fototerapia, por lo que nuestro hallazgo amplía la lista de factores predictores de respuesta y aporta nuevas evidencias en el conocimiento de la respuesta al tratamiento con UVBnb en Psoriasis.

La respuesta terapéutica de UVBnb en Psoriasis se basa en un efecto citotóxico directo sobre los linfocitos, las DCs, las células de Langerhans, la inducción de apoptosis en los queratinocitos y la promoción de células T reguladoras.<sup>91,414</sup> Normalmente, la elección de la modalidad de fototerapia se realiza en base a las características clínicas del paciente. Placas gruesas, muy queratósicas e infiltradas,<sup>415</sup> un fototipo bajo<sup>416</sup> y el estrés psicológico<sup>417</sup> auguran una peor respuesta, mientras que el sexo femenino y un menor IMC favorecen una mejor respuesta a UVBnb.<sup>418</sup> Existen factores genéticos conocidos como el receptor 1 de la melanocortina (*MC1R*)<sup>419</sup> y el enzima glutathione-S-transferasa (*GST*)<sup>420</sup> que influyen en el fototipo y la sensibilidad a la radiación ultravioleta respectivamente, pero no en una mejor respuesta a fototerapia.

El polimorfismo de *VDR* es el único factor genético predictivo al tratamiento con UVBnb conocido hasta la fecha. En concreto, los pacientes homocitogotos CC para el polimorfismo *VDR* rs731236 asociado a una menor actividad del receptor mostraron una menor duración de la remisión inducida por UVBnb.<sup>413</sup> Este hecho es relevante dado que la vitamina D es capaz de modular la actividad de *TLR9* por lo que el mecanismo por el que induciría una mayor remisión podría ser el mismo como se discute a continuación.

*TLR9* está implicado en la activación de las pDCs que promueven la inflamación en la placa de Psoriasis. Un genotipo hipoactivo permitiría obtener una respuesta más rápida y más longeva en los pacientes tratados con UVBnb (o cualquier otra terapia eficaz). Si embargo, si bien al principio se consideraba que el polimorfismo identificado parecía

asociarse a una forma hipoactiva del receptor,<sup>421</sup> los últimos estudios apuntan todo lo contrario; la variante genotípica TC/CC de *TLR9* rs187084 induce una mayor transcripción y, supuestamente, una mayor actividad funcional del receptor.<sup>166</sup>

Otra posible hipótesis atribuiría la mejor respuesta a UVBnb a las características inmunopatogénicas de la placa de Psoriasis. Es decir, placas de psoriasis de pacientes con *TLR9* más transcritos y más activos podrían responder mejor a fototerapia dado que ésta induce un daño directo en las DCs, dañando su DNA, disminuyendo sus dendritas, la expresión de moléculas MHC y co-estimuladoras y, así, su capacidad inmunológica. Además, la radiación UV también provoca la migración de las DCs a los ganglios linfáticos provocando su depleción en la piel.<sup>422</sup> Por lo tanto, pacientes con DCs muy activas serían candidatos idóneos para recibir un tratamiento que tuviera un impacto tan profundo en la actividad de estas células como la UVBnb.

Es interesante el hecho que tanto el polimorfismo *VDR* como el sexo femenino se asocien a una mejor respuesta a UVBnb (ya sea en forma de mayor periodo de remisión o alcanzando una respuesta satisfactoria más rápido),<sup>413</sup> y ambas variables están relacionadas con la actividad de TLR9. En primer lugar, varios estudios han demostrado que la vitamina D3 ejerce parte de su función antiinflamatoria mediante la supresión de la expresión de *TLR9*. *Dai et al.* estudiaron la expresión TLR9 en un modelo murino de colitis y observaron una menor expresión de TLR9 y un menor daño orgánico en los ratones tratados con vitamina D3.<sup>423</sup> *Dickie et al.* demostraron que la vitamina D3 disminuye la expresión de TLR2, 4 y 9 en leucocitos humanos, provocando una menor actividad del receptor TLR9.<sup>424</sup> *Suzuki et al.* demostraron los efectos selectivos de un análogo de la vitamina D3, calcipotriol (CAL), sobre las pDCs. CAL disminuyó la producción de INF- $\alpha$  por parte de las pDCs sin alterar la producción de TNF- $\alpha$  por las mDCs. Además, demostraron cómo CAL reducía la expresión de TLR9 y disminuía la actividad quimiotáctica de las pDCs en un modelo murino, induciendo la depleción de estas células en la placa de psoriasis inducida con imiquimod.<sup>425</sup> Todo ello, en consonancia al conocido efecto terapéutico de los derivados de la vitamina D3 en el tratamiento tópico de la Psoriasis.<sup>87</sup> Finalmente, *Yazdanpanah et al.* observaron como la vitamina D3 disminuía la expresión de los TLRs intracelulares 3, 7 y 9 en pacientes con

## DISCUSIÓN

LES.<sup>426</sup> Sin conocerse exactamente el mecanismo por el que la vitamina D3 induce una menor expresión de TLR9, se podría suponer que la variante -1486 TC/CC (rs187840) del promotor de *TLR9* asociada a una mejor y más duradera respuesta a UVBnb podría facilitar la acción de la vitamina D3 sobre TLR9. Ello explicaría la relación entre ellos y su influencia en la respuesta al tratamiento con UVBnb.

En segundo lugar, el sexo femenino asociado a una mejor respuesta a UVBnb también podría estar relacionado con la actividad de TLR9. Estudios recientes demuestran como el sexo femenino y el uso de anticonceptivos estrogénicos modulan la actividad de TLR9. *Fischer et al.*<sup>166</sup> observaron como la estimulación con  $\beta$ -estradiol o estrona disminuía la expresión de TLR9 en los leucocitos de mujeres sanas, y que esta disminución dependía del polimorfismo del receptor, que contiene entre otros distintos dominios de unión para NFkB y para estrógenos  $\alpha$ , muy cerca de los polimorfismos de *TLR9* estudiados. *Hasan et al.*<sup>427</sup> demostraron en su trabajo cómo complejos formados por NF-kB y estrógenos  $\alpha$  se unen a un determinado dominio del promotor de TLR9 para inhibir su transcripción, demostrando así la influencia de los estrógenos en la transcripción del receptor y condicionando una peor respuesta antiviral frente a VPH. De un modo similar, los cambios inducidos por el polimorfismo *TLR9* rs187084 podrían facilitar la unión de distintos factores modificadores de la transcripción del receptor como la vitamina D3 y los estrógenos presentes en las mujeres y así, inducir una mejor respuesta y duradera al tratamiento con UVBnb.

Nuestro estudio no aporta evidencias en este sentido. Para ahondar en este aspecto, debería analizarse la influencia de *TLR9* rs187084 en el tratamiento con UVBnb teniendo en cuenta los niveles séricos de vitamina D3 (o bien administrando aleatoriamente vitamina D3 en algunos de los participantes), y realizar un análisis por sexo. Ello requiere de un nuevo diseño y probablemente, de un mayor número de participantes.

### 3. Papel del receptor linfocítico CD6 en la enfermedad psoriásica

Los trabajos publicados en relación al tratamiento de la Psoriasis con el AcMo anti-CD6 Itolizumab muestran resultados terapéuticos satisfactorios y un buen perfil de seguridad.<sup>191,192,293,294,297</sup> Sin embargo, hasta la fecha no existían otras evidencias del papel de CD6 en la fisiopatogenia de la enfermedad. Teniendo en cuenta la compleja función de CD6 en la homeostasis de las células T periféricas, CD6 podría estar implicado en la modulación de su activación y diferenciación hacia una estirpe Th17. De este modo, una mayor actividad del receptor induciría una mayor respuesta inmunitaria adaptativa Th17 y consecuentemente una mayor gravedad de la enfermedad. Ello, sería coherente con los efectos terapéuticos observados con Itolizumab. Nuestro trabajo aporta las primeras evidencias genéticas, experimentales *in vivo* e *in vitro* del papel fisiopatogénico del receptor linfocítico CD6 en Psoriasis.

#### 3.1. Evidencia genética del receptor linfocítico CD6 en Psoriasis

Desde el punto de vista genético, cabe destacar que ningún estudio GWAS ha identificado *CD6* como factor genético asociado a la enfermedad. Tampoco es de extrañar por distintos motivos. En primer lugar, los estudio GWAS de enfermedades complejas y poligénicas como la Psoriasis se basan en la detección de una mayor frecuencia de SNPs pre-seleccionados de los *loci* analizados sin conocer bien en muchas ocasiones sus implicaciones funcionales sobre el gen en cuestión. Por otro lado, los análisis GWAS se diseñan habitualmente para identificar genes de susceptibilidad ya que convencionalmente, los grupos que se comparan son enfermos *vs.* individuos sanos. Ello no permite entre otras cosas, identificar genes que, si bien no son responsables de la aparición de la enfermedad, pueden modificar e influir en otros aspectos clínicos más sutiles como la gravedad, la precocidad o la aparición de comorbilidades. Para ello, los estudios específicos de gen potencialmente implicados en la enfermedad como el presentado en esta Tesis Doctoral son de gran utilidad.

En nuestro estudio, se incluyeron 3 SNPs del receptor linfocítico *CD5* por tratarse de un gen contiguo y guardar una gran homología con *CD6* tanto desde el punto de vista estructural como funcional.<sup>196</sup> Ambos receptores están físicamente relacionados con el

## DISCUSIÓN

receptor clonotípico antígeno-específico TCR y contribuyen a la modulación fina de las señales de activación y diferenciación mediadas por este importante receptor.<sup>208,267</sup> Además, se incluyó *el análisis de ALCAM/CD166*, el gen codificante del principal ligando conocido de CD6, para aportar una mayor comprensión al análisis sobre la contribución de estos receptores.

Ningún SNP analizado se asoció a un mayor riesgo de la enfermedad como se deduce del estudio comparativo entre las frecuencias alélicas y genotípicas entre la cohorte de pacientes y el grupo control. Por otro lado, ningún SNP de *CD5* ni *ALCAM/CD166* mostró asociación alguna en relación a la gravedad, precocidad o presencia de artritis, descartando estos SNPs como factores modificadores de la enfermedad psoriásica.

Sin embargo, los tres SNPs analizados de *CD6* sí se asociaron a una mayor (rs17824933<sup>G</sup>) y menor (rs11230563<sup>T</sup> y rs12360861<sup>A</sup>) gravedad de Psoriasis, definida tanto por una mayor necesidad de tratamiento sistémico como por una mayor puntuación PASI. Estos resultados se replicaron tanto en el estudio alélico, genotípico como haplotípico, siendo la combinación haplotípica más intensamente asociada a una menor gravedad de la enfermedad la CTA y CTG. Además, uno de los SNPs asociado con una mayor gravedad de la psoriasis (rs17824933<sup>G</sup>) se asoció también al debut precoz de la enfermedad. En conjunto, los datos obtenidos en nuestro estudio, sugieren una clara influencia de *CD6* en el fenotipo de la enfermedad, modulando según la presencia de las variantes alélicas analizadas, la gravedad y, posiblemente, la precocidad de la enfermedad. Esta influencia como factor modificador de enfermedad en Psoriasis se antoja específica del receptor linfocítico CD6 y se desmarca de CD5 y ALCAM/CD166.

El mecanismo exacto por el que los SNPs de *CD6* favorecerían una mayor gravedad de la Psoriasis es desconocido. Estos tres polimorfismos afectan la expresión del receptor CD6 en las células T<sup>273,281,282</sup> por lo que podrían modificar la actividad del receptor y a la postre la actividad inflamatoria de la enfermedad. Sin embargo, los resultados obtenidos y el impacto de cada SNP en la función del receptor no son fáciles de

interpretar. En nuestro análisis, rs17824933<sup>G</sup> se asoció a una mayor gravedad de la enfermedad. Este polimorfismo favorece la expresión de la isoforma CD6ΔD3 del receptor que carece del dominio extracelular D3 de unión con ALCAM/CD166 e impide su localización junto a TCR en el centro de la SI.<sup>428</sup> Este mismo alelo además, se ha asociado a un mayor riesgo de EM.<sup>281</sup> De este modo, una menor expresión del receptor íntegro determina una mayor gravedad de la enfermedad. Dado que los linfocitos de los individuos rs17824933<sup>GG</sup> presentaron una menor tasa de proliferación y una menor migración de células Treg al SNC, los autores argumentaron que el déficit funcional del receptor podría condicionar un ambiente más autoreactivo y favorecer la aparición de enfermedad.<sup>281</sup> Algo similar podría ocurrir también en Psoriasis.

En segundo lugar, rs11230563<sup>T</sup> y rs12360861<sup>A</sup> se asociaron a una menor gravedad de la enfermedad psoriásica. El primer alelo favorece una menor expresión del receptor<sup>282</sup> y el segundo una mayor expresión de la isoforma CD6ΔD3,<sup>285</sup> respectivamente. Podría interpretarse que una menor expresión del receptor CD6 condiciona una menor activación y polarización de las células T y provocaría una menor actividad de la enfermedad.<sup>282</sup> De entrada, estos datos parecen incoherentes y no guardan una lógica molecular sencilla. Sin embargo, sí existe una coherencia entre la forma alélica de los 3 SNPs y su asociación con una mayor/menor gravedad de la Psoriasis y un mayor/menor riesgo para EM. Por ello, quizá otros factores y no sólo la expresión del receptor determinada individualmente por cada SNP podrían explicar la influencia de CD6 en la gravedad de la Psoriasis y su relación con la EM.<sup>281,282,285</sup>

Dado el gran *linkage disequilibrium* existente entre los tres SNPs, una posible explicación sería que en realidad, el efecto funcional en el receptor está determinado por un solo SNP de los tres analizados. Teniendo en cuenta que las combinaciones haplotípicas identificadas más intensamente asociadas a una menor gravedad son CTA y CTG, parece lógico pensar que la mayor influencia viene dada por los dos primeros SNPs (rs17824933 y rs11230563). Para determinar qué efecto real tiene este haplotipo en la expresión del receptor, sería deseable realizar estudios funcionales e inmunofenotípicos y esclarecer si existe en realidad una mayor o menor expresión funcional de la forma íntegra del receptor. El estudio del SNP rs2074225 que en

## DISCUSIÓN

haplotipo con rs11230563 se asocia a una mayor expresión del receptor en células CD4+, CD8+ y NK también debería incluirse en el análisis.

Otro posible mecanismo que explicara estos resultados recae en la avidéz del receptor. La afinidad de CD6 por sus ligandos podría verse modificada con la presencia de los distintos SNPs analizados. Por ello, debería estudiarse en profundidad el impacto de estos polimorfismos con los ligandos conocidos de CD6 ya que dicha interacción podrían modificar la actividad del receptor y desarrollar un papel determinante en la enfermedad. En este sentido, cabe destacar el potencia papel de CD318, un ligando de CD6 descrito recientemente,<sup>258</sup> asociado a la gravedad de EM<sup>190</sup> y AR<sup>265,279</sup> y cuya expresión en células epiteliales, mesenquimales y algunas células hematopoyéticas está favorecida por la presencia de citocinas proinflamatorias, se postula como una nueva molécula a estudiar en la fisiopatogenia de la Psoriasis.<sup>253</sup>

La presencia de inserciones en CD6 se ha asociado curiosamente a una mejor respuesta a la terapia biológica anti-TNF $\alpha$  en una cohorte danesa de pacientes con AR,<sup>429</sup> y el polimorfismo rs11230563 a la EB en una cohorte china de etnia Han.<sup>286</sup> Pero la enfermedad más estudiada, tal y como se ha comentado en la introducción, es la EM en la que, al igual que en Psoriasis, se ha establecido claramente el importante papel patogénico de la respuesta Th17.<sup>430</sup> El mecanismo por el cual CD6 influye en la EM no está bien definido y contempla varios aspectos fisiopatogénicos como la promoción de una respuesta Th17,<sup>190</sup> una menor proliferación de Tregs<sup>281</sup> y quizá una mayor migración al SNC mediada por CD6 y ALCAM/CD166.<sup>253</sup> Los estudios más recientes con AcMos dirigidos al dominio extracelular D1 en modelos animales<sup>190,298</sup> sugieren que estos fármacos mejoran la enfermedad al bloquear la existencia de ligandos alternativos de CD6.D1, como por ejemplo CD318.<sup>258</sup>

Teniendo en cuenta la función de CD6 en la homeostasis de las células T y sus distintos ligandos, es razonable plantear que una mayor activación y diferenciación de células Th17 patogénicas mediada por CD6 influirá en el desarrollo de la Psoriasis y demás enfermedades autoinmunitarias Th17. Si esta función se desarrolla mediante la

expresión de formas incompletas del receptor o bien está mediada por nuevas o más intensas interacciones con los ligandos de CD6 está fuera del alcance de nuestro proyecto.

### **3.2. Evidencia experimental *in vivo* e *in vitro* del papel del receptor linfocítico CD6 en un modelo murino de Psoriasis**

El estudio de la influencia de CD6 en un modelo murino de Psoriasis inducido por IMQ nos ha permitido aportar nuevas evidencias del papel fisiopatogénico de este receptor en la enfermedad. Los ratones CD6<sup>-/-</sup> mostraron un fenotipo atenuado de la enfermedad en comparación con los controles CD6<sup>+/+</sup>, probablemente por una menor polarización Th17 tal y como se ha descrito en la EAE.<sup>190</sup> Este fenotipo más leve de la enfermedad se plasmó en un menor grosor de la epidermis y en una menor producción de mRNA de IL-17A e IL-22. Es de destacar que la expresión de mRNA de otras moléculas propias de una respuesta Th1 como IL-6, INF- $\gamma$  y Treg como FoxP3 no alcanzaron diferencias estadísticamente significativas.

Se desconocen las bases moleculares por las que CD6 influiría en la polarización Th17. Sin embargo, este efecto podría no ser específico y afectar a la polarización de otras estirpes linfocitarias como Th1<sup>269</sup> y Tregs<sup>179</sup>. Así, la influencia de CD6 en la polarización linfocitaria podría ser más de cuantitativa (intensidad) que cualitativa (estirpe-específica). Este hecho guarda coherencia con el hecho que CD6 influya en la gravedad y no en la susceptibilidad de la Psoriasis. En consecuencia, el bloqueo de CD6 mediante un agente farmacológico (p.e. Itolizumab) podría ser de utilidad no sólo en Psoriasis sino en otras enfermedades autoinmunitarias en las que existiera una respuesta adaptativa aberrante patogénica.<sup>298</sup>

Finalmente, nuestros estudios *in vitro* realizados con linfocitos T provenientes de ratones CD6<sup>+/+</sup> y CD6<sup>-/-</sup> mostraron cómo la presencia de CD6 influía en la polarización Th17 pero no en la Th1. Estos resultados son contradictorios con los anteriormente reportados por *Nair et al.* cuyos resultados mostraron la influencia de CD6 en el

## DISCUSIÓN

desarrollo de una respuesta adaptativa Th1.<sup>269</sup> Estos autores aislaron leucocitos de sangre periférica de voluntarios sanos con más de un 70% CD3+ para su ensayo *in vitro*. En nuestro estudio, se utilizaron células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup> procedentes de ratones CD6<sup>-/-</sup> y CD6<sup>+/+</sup>. Quizá, el distinto origen y población celular utilizados en estos dos estudios pueda explicar dichas diferencias. Ello debería contrastarse tanto en nuevos estudios *in vitro* como en los distintos modelos experimentales de enfermedades autoinmunitarias. Es posible que el receptor CD6 ejerza una mayor influencia en la activación y polarización de una determinada estirpe celular y se postule como diana terapéutica para las enfermedades mediadas por una misma respuesta linfocitaria aberrante (p.e. Th17) como apuntan los resultados presentados en esta Tesis Doctoral. De hecho, Itolizumab se ha mostrado eficaz en Psoriasis<sup>191,192,293,294,297</sup> pero también en AR<sup>193,194</sup>, y nuevas evidencias apuntan a un posible efecto terapéutico en EM,<sup>190</sup> todas ellas enfermedades en las que la respuesta Th17 es protagonista.<sup>431</sup>

En conclusión, los resultados de la presente Tesis Doctoral aportan nuevas evidencias del importante papel que ejerce CD6 en Psoriasis como factor modificador de la enfermedad, concretamente en su gravedad. Si bien el mecanismo íntimo por el que CD6 ejerce su influencia no está totalmente definido, todos los datos inmunogenéticos aportados demuestran su relevancia en Psoriasis. CD6 influiría en la intensidad de la respuesta inmunitaria adaptativa Th17 que subyace en la enfermedad. Esta influencia podría darse no solo en Psoriasis sino expandirse a otros procesos mediados por una polarización linfocitaria aberrante Th17 y, quizá, de otras estirpes celulares.

#### **4. Polimorfismos *FCGR2A* y *FCGR3A* en la respuesta al tratamiento biológico anti-TNF- $\alpha$ en Psoriasis**

Considerando que es razonable pensar que la eficacia de los fármacos biológicos pueda estar relacionada con la porción Fc de su estructura, diseñamos un proyecto para estudiar la asociación de 2 SNPs con impacto funcional en los Fc $\gamma$ Rs y la respuesta al tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$ . La respuesta fue valorada mediante 2 parámetros ampliamente validados como son el PASI y el BSA en 70 pacientes con Psoriasis moderada-grave tratados con fármacos biológicos en distintos puntos del seguimiento y realizamos un estudio de asociación con los genotipos de los polimorfismos de *FCGR2A*-H131R y *FCGR3A*-V158F.

En primer lugar, encontramos una tendencia a una mayor respuesta PASI75 y una mayor reducción del PASI y del BSA en los pacientes con genotipos *FCGR2A* y *FCGR3A* homocigotos de baja afinidad (RR y FF, respectivamente) a la semana 12 de tratamiento en comparación con los pacientes con genotipos homo- o heterocigotos para alelos de alta afinidad (HR+HH y VF+VV). Además, ningún paciente con genotipo de baja afinidad presentó un fracaso terapéutico (respuesta <PASI50). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas al compararlas.

En segundo lugar, analizamos cronológicamente la influencias de estos polimorfismos en la respuesta terapéutica y observamos cómo los genotipos con alelos de alta afinidad se asociaban de manera significativa a una mayor y más rápida reducción del BSA en el punto intermedio del seguimiento. Esta asociación se mantuvo significativa en el análisis multivariado independientemente al sexo, edad, eficacia del anti-TNF $\alpha$  empleado y al BSA<sub>inicial</sub>.

Dado que ambos polimorfismos mostraron un patrón de respuesta similar, decidimos analizarlos en su conjunto. Para aumentar la potencia y evitar un estudio estadístico con haplotipos con baja representación en alguna de sus combinaciones, analizamos el número total de alelos de alta afinidad en cada haplotipo. De este modo, se creó una nueva variable del 0-4 que expresaba el número de alelos de alta afinidad en el

## DISCUSIÓN

haplotipo de cada paciente. El análisis de regresión lineal mostró una asociación inversa entre el número de haplotipos y el valor  $BSA_{intermedio}$ , de tal modo que a mayor número de alelos de alta afinidad, menor afectación de la superficie corporal en el punto intermedio del seguimiento. Todo ello sugiere que ambos polimorfismos podrían actuar en sinergia, posiblemente en un mismo mecanismo inmunofarmacológico. La acción simultánea de los alelos de alta afinidad *FCGR2A*-H131 y *FCGR3A*-V158 podría potenciar la ADCC de células patogénicamente relevantes que expresaran TNF- $\alpha$  y favorecer una más rápida respuesta terapéutica. De hecho, la apoptosis de células continentales de TNF- $\alpha$  por parte de macrófagos y células NK ha sido implicada como un mecanismo importante en la respuesta al tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$  en Psoriasis.<sup>432</sup> Nuestros resultados sugieren un efecto farmacodinámico mediado por los SNPs de los *FCGRs* estudiados. El porqué este efecto se mostró estadísticamente significativo con el  $BSA_{intermedio}$  pero no con el  $PASI_{intermedio}$  es una incógnita. Quizá, la mayor respuesta ADCC favorecida por los SNPs de los *FCGRs* estudiados permitiría de manera más eficaz aclarar las placas menos infiltradas, eritematosas y descamativas, favoreciendo una mayor reducción del BSA respecto al PASI, que no solo tiene en cuenta la superficie afectada sino también los otros parámetros mencionados.

En tercer lugar, analizamos la importante respuesta terapéutica que mostraron los pacientes con genotipos de baja afinidad en la segunda mitad del tratamiento, alcanzando y mejorando los resultados de los pacientes con genotipos con alelos de alta afinidad. Pese a que las diferencias en la respuesta en la segunda mitad del seguimiento no fueron estadísticamente significativas, sí parecen clínicamente relevantes y podrían responder a una mayor eficacia del fármaco anti-TNF $\alpha$  mediada no por un efecto directo sobre células patogénicamente relevantes sino por un menor aclaramiento del fármaco, permitiendo su acumulación en sangre, alcanzar mayores niveles serológicos y, en consecuencia, un mayor efecto terapéutico. Así, se establecería un segundo mecanismo farmacocinético por el que, tras las primeras semanas de tratamiento, los genotipos de baja afinidad de *FCGR2A* y *FCGR3A* favorecerían una mayor respuesta terapéutica. En este sentido, *Nishio et al.* describieron un menor aclaramiento de INF en pacientes con RA favorecido probablemente por sus genotipos de baja afinidad.<sup>433</sup>

De este modo, los resultados observados sugieren un primer efecto farmacodinámico de los polimorfismos de *FCGR2A* y *FCGR3A* que favorecerían una rápida respuesta terapéutica en las primeras semanas de tratamiento. Posteriormente, en las siguientes semanas se produciría un segundo efecto farmacocinético mediante el cual, los genotipos de baja afinidad favorecerían un menor aclaramiento del fármaco anti-TNF $\alpha$  permitiendo así alcanzar mayores niveles en sangre y un mayor eficacia del tratamiento.

En realidad, el proyecto presentado en esta Tesis Doctoral es un estudio piloto y presenta múltiples limitaciones que dificultan la interpretación de los resultados y la traslación de éstos a la práctica clínica habitual. En primer lugar, la duración del seguimiento es hoy en día inadecuada. En el momento del diseño del estudio (los primeros años de la era biológica en Psoriasis), los ensayos clínicos y los pequeños estudios que se realizaban marcaban como principal variable de respuesta al tratamiento el PASI75 a la semana 12. Sin embargo, actualmente, tras más de 10 años de experiencia, se prefiere utilizar la semana 24 como punto óptimo para valorar la eficacia de un tratamiento antes de decidir si es útil o no, y se prefiere realizar largos seguimientos para obtener resultados de eficacia y supervivencia del fármaco útiles para la toma de decisiones en práctica clínica. Sin embargo, nuestros resultados son relevantes e invitan a los investigadores a profundizar en la influencia de los polimorfismos de *FCGRs* como marcadores farmacogenéticos del tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$  en Psoriasis.

Otros autores han estudiado estos mismos polimorfismos en la respuesta al tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$  en múltiples procesos reumatológicos. El primer estudio publicado por *Tutuncu et al.*<sup>383</sup> observaron una mejor respuesta asociada al genotipo homocigoto de baja afinidad *FCGR3A* (FF) a los 3 meses de tratamiento en 35 pacientes con AR y APs tratados con INF, ADA y ETN. Los autores sugerían un menor aclaramiento del fármaco mediada por la interacción Fc $\gamma$ RIIIA-Fc del fármaco por los fagocitos como el mecanismo más plausible del mayor efecto terapéutico. *Nishio et al.* aportaron nuevas evidencias al respecto en un estudio farmacocinético con INF en pacientes con genotipos de baja afinidad para *FCGR2A* y *FCGR3A* que presentaban un aclaramiento francamente reducido del fármaco.<sup>433</sup> En 2009, *Cañete et al.* detectaron una asociación entre los genotipos de baja afinidad de ambos polimorfismos y una mejor respuesta a

## DISCUSIÓN

INF en pacientes con AR en distintos puntos del seguimiento clínico.<sup>384</sup> Los pacientes con el genotipo homocigoto de baja afinidad *FCGR3A* (FF) presentaban una mejor respuesta en semana 6, mientras que los pacientes para el genotipo homocigoto de baja afinidad *FCGR2A* (RR) en semana 20.

Más recientemente, la asociación entre el genotipo homocigoto de baja afinidad *FCGR2A* (RR) y una mejor respuesta al tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$  fue confirmada por *Montes et al.*<sup>386</sup> y *Dávila-Fajardo et al.*<sup>387</sup> en un estudio con 429 y 302 pacientes con AR tratados con INF y ADA, respectivamente. En su estudio, *Avila-Pedretti et al.* observaron diferencias estadísticamente significativas en los pacientes tratados con ADA y en un subgrupo de pacientes anti-CCP+ tratados con ADA e INF.<sup>385</sup> El meta-análisis conducido por *Lee et al.* concluyó que en AR el genotipo *FCGR2A* de baja afinidad (RR) se asociaba a una mejor respuesta terapéutica anti-TNF $\alpha$ .<sup>315</sup> En un intento de replicar estos resultados con el polimorfismo *FCGR3A* -V158F, *Montes et al.* reclutaron 429 pacientes con AR tratados con anti-TNF $\alpha$  durante un año sin observar ninguna influencia del polimorfismo en la respuesta terapéutica.<sup>434</sup> Estas evidencias señalan a *FCGR2A*-H131R como un polimorfismo más influyente que *FCGR3A* -V158F en la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  de la AR. Sorprendentemente, ninguno de ellos ha sido identificado en los estudios GWAS realizados hasta la fecha.<sup>435</sup>

Por otro lado, *Morales-Lara et al.*<sup>388</sup> estudiaron la respuesta a INF en pacientes con AR, APs y EA. Sus resultados coincidieron con de *Cañete et al.* en relación a la AR, observando una mejor respuesta en pacientes con el genotipo *FCGR3A* de baja afinidad (FF). Por el contrario, en las espondiloartropatías (APs y EA) eran los pacientes con el alelo de alta afinidad (V) los que mejor respondían al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Del mismo modo, *Ramírez et al.*<sup>389</sup> observaron que al contrario que en AR, en pacientes con APs eran los genotipos *FCGR2A* con alelos de alta afinidad (HR+HH) los que favorecían una mejor respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Así, la influencia de los polimorfismos de *FCGR2A* y *FCGR3A* podría depender no solo del momento del tratamiento, sino también de la inmunofisiopatogenia específica de la enfermedad en cuestión, siendo más favorable los genotipos de baja afinidad de *FCGR2A* para la AR y

los de alta afinidad para las espondiloartropatías. No obstante, un meta-análisis que incluía pacientes con Psoriasis, espondiloartropatías y EC concluyó que de manera global, los pacientes con el alelo de baja afinidad para *FCGR2A* (R) y alta afinidad para *FCGR3A* (V) presentaban a los 6 meses una mejor respuesta terapéutica, contradiciendo los resultados anteriormente expuestos.<sup>390</sup> Para esclarecer qué relación existe entre estos polimorfismos y la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en las enfermedades reumatológicas, sería conveniente estudiar esta influencia utilizando unos criterios comunes y bien definidos que permitieran individualizar y comparar resultados en función de la enfermedad tratada, fármaco empleado, variables de respuesta y tiempo de seguimiento.

En Psoriasis, existen menos estudios que hayan analizado en detalle esta relación. Como se ha comentado, el primero de ellos es el que se presenta en esta Tesis Doctoral. Posteriormente, *Batalla et al.*<sup>391</sup> replicaron el estudio en una cohorte de 115 pacientes con Psoriasis moderada-grave tratados con fármacos biológicos anti-TNF $\alpha$  (Infliximab, Adalimumab y Etanercept). No hallaron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta al tratamiento entre los pacientes con polimorfismos de baja y alta afinidad de *FCGR2A* y *FCGR3A*. Sin embargo, al igual que en nuestro estudio, sí existía una tendencia a una mejor respuesta terapéutica en los pacientes con genotipos de baja afinidad de ambos polimorfismos.

En un reciente estudio realizado por *Prieto-Pérez et al.* observaron una peor respuesta en los individuos con alelos de baja afinidad de *FCGR2A* (HR+RR) a los 6 meses de tratamiento anti-TNF $\alpha$  en una cohorte de 144 pacientes con Psoriasis moderada-grave.<sup>392</sup> Por otro lado, *Mendrinou et al.* estudiaron la influencia de *FCGR2A* y *FCGR3A* en una cohorte de 100 pacientes con Psoriasis moderada-grave tratados con anti-TNF $\alpha$ . No observaron influencia alguna del polimorfismo de *FCGR2A*; sin embargo, el polimorfismo de alta afinidad *FCGR3A* (V) sí parecía modificar dicha respuesta en un modo dominante, principalmente en los pacientes con ETN.<sup>436</sup> Estos resultados son opuestos y contradictorios entre ellos y a los obtenidos en nuestro estudio si bien no son totalmente comparables por el distinto momento de valoración. El importante LD entre los genotipos RR+VV y HH+FF frecuentemente no calculado en

## DISCUSIÓN

los estudios publicados podría explicar estos resultados dispares. Ello explicaría el por qué en muchos estudios los alelos de baja afinidad de *FCGR2A* (R) y los de alta afinidad de *FCGR3A* (V) son los más habitualmente identificados como marcadores farmacogenéticos en la respuesta al tratamiento biológico.<sup>437</sup>

Quizá, estudios más ambiciosos, con mayor número de pacientes, de mayor duración y con un solo fármaco podrían detectar diferencias estadísticamente significativas que permitieran tomar decisiones terapéuticas a favor a un mejor tratamiento personalizado en pacientes con Psoriasis moderada-grave candidatos al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Además, sería deseable incorporar en estos estudios un análisis farmacocinético del fármaco para valorar los resultados con una mayor perspectiva farmacológica.

En cualquier caso, analizando los resultados de estos primeros estudios, el efecto en el tratamiento anti-TNF $\alpha$  (y por extensión, biológico) en la Psoriasis podría ser discreto y fluctuante en el tiempo, hecho que minimizaría la utilidad en una enfermedad que requiere un tratamiento a largo plazo. El estudio de la influencia de estos polimorfismos podría tener interés en pacientes con una excelente respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en vistas a reducir la dosis o aumentar el periodo de administración. Por otro lado, sería interesante analizar este efecto en otros fármacos biológicos no anti-TNF como Ustekinumab, Secukinumab o Ixekizumab. De hecho, un aspecto a tener en cuenta es la incorporación al arsenal terapéutico de la Psoriasis de fármacos biológicos con Fc de distintos isotipos a IgG<sub>1</sub>, como Ixekizumab que contiene una Fc IgG<sub>4</sub>, que prácticamente no se une a los receptores Fc $\gamma$ I, Fc $\gamma$ IIA ni Fc $\gamma$ IIIA.<sup>438</sup> Quizá, dichos fármacos presenten un perfil farmacocinético más favorable al evitar la interacción con el sistema Fc $\gamma$ Rs y sean seleccionados como los más apropiados para el tratamiento biológico de la Psoriasis moderada-grave en práctica clínica habitual.<sup>439,440</sup>

En definitiva, el estudio presentado en esta Tesis Doctoral abrió en su momento un campo de investigación en Psoriasis inspirado en el mecanismo farmacológico de los fármacos biológicos anti-TNF $\alpha$  y en otros estudios farmacogenéticos desarrollados en otras disciplinas de la medicina como la oncología y la reumatología. Pese a los nuevos

estudios realizados en Psoriasis, la evidente influencia de los polimorfismos de *FcγRIIA*-H131R y *FcγRIIIA*-V158F en el tratamiento biológico anti-TNF de la psoriasis queda aún por esclarecer en su justa medida.

En esta Tesis Doctoral se presenta el estudio de receptores del SI innato y adaptativo en la fisiopatogenia de la Psoriasis como factores de susceptibilidad y modificadores de la enfermedad, y como marcadores de respuesta al tratamiento. El conocimiento de los mecanismos fisiopatogénicos permite no solo conocer el porqué de la enfermedad y las diferencias interindividuales entre los pacientes sino identificar posibles dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos basados en una medicina individualizada. Por otro lado, la identificación de marcadores de respuesta al tratamiento permite en primer lugar seleccionar aquellos pacientes idóneos para una terapia en cuestión y, en segundo lugar, posibilita la modificación y el rediseño de los fármacos para mejorar su eficacia y seguridad terapéutica.



## **CONCLUSIONES**

---



## VI. CONCLUSIONES

1. La Psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica compleja en la que participan múltiples factores ambientales y genéticos que interactúan entre ellos para definir el fenotipo de la enfermedad.
2. Los mecanismos inmunológicos relevantes en la fisiopatogenia de la Psoriasis tanto del SI innato (p.e. TLRs, FcγRs o los AMPs) como adaptativo (p.e. HLA, TCR o CD6) contribuyen al desarrollo de la enfermedad, ya sea como factor de susceptibilidad, factor modificador del fenotipo o factor de respuesta al tratamiento.
3. Cambios genéticos con un impacto funcional en receptores clave en Psoriasis modifican la expresión de la enfermedad o su respuesta terapéutica, y explican la variabilidad interpersonal entre los pacientes con Psoriasis.
4. Los receptores *Toll-like* sensores de ácidos nucleicos TLR3, TLR7 y TLR9 juegan un papel relevante en la fisiopatogenia de la Psoriasis, contribuyendo a definir el fenotipo de la enfermedad y la respuesta al tratamiento con UVBnb.
5. El receptor linfocítico CD6, capaz de modular la respuesta asociada al receptor clonotípico TCR y regular la homeostasis de las distintas poblaciones linfocitarias, modula la intensidad de la polarización Th17 propia de la Psoriasis y a definir su gravedad.
6. La eficacia de las terapias biológicas que interactúan con los elementos propios del SI está influenciada por las características intrínsecas de éste.
7. Los polimorfismos de los receptores Fc-gamma influyen en la respuesta del tratamiento biológico en Psoriasis, tanto desde un punto de vista farmacocinético como farmacodinámico.

## CONCLUSIÓN

8. Los estudios centrados en genes seleccionados por su impacto en la fisiopatogenia de la enfermedad son útiles y complementarios a otras estrategias de aproximación como los *genome-wide association studies* (GWAS), y ayudan a definir factores inmunogenéticos modificadores de la enfermedad así como factores farmacogenéticos de respuesta al tratamiento.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. Jul 30 2009;361(5):496-509.
2. Mueller W, Herrmann B. Cyclosporin A for psoriasis. *The New England journal of medicine*. Sep 6 1979;301(10):555.
3. Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:385-422.
4. Burden AD, Kirby B. Psoriasis and related disorders. *Rook's Textbook of Dermatology*. Chichester, UK.: Wiley-Blackwell; 2016.
5. Ellinghaus D, Jostins L, Spain SL, et al. Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nature genetics*. May 2016;48(5):510-518.
6. Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer AB, Jr., Reboussin DM. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Sep 1999;41(3 Pt 1):401-407.
7. Gottlieb AB, Dann F. Comorbidities in patients with psoriasis. *Am J Med*. Dec 2009;122(12):1150 e1151-1159.
8. Koo J, Marangell LB, Nakamura M, et al. Depression and suicidality in psoriasis: review of the literature including the cytokine theory of depression. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. Jul 6 2017.
9. Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, et al. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *The Journal of investigative dermatology*. Feb 2013;133(2):377-385.
10. Ferrandiz C, Carrascosa JM, Toro M. Prevalence of psoriasis in Spain in the age of biologics. *Actas dermo-sifiliograficas*. Jun 2014;105(5):504-509.
11. Hagg D, Eriksson M, Sundstrom A, Schmitt-Egenolf M. The higher proportion of men with psoriasis treated with biologics may be explained by more severe disease in men. *PLoS One*. 2013;8(5):e63619.
12. Gelfand JM, Troxel AB, Lewis JD, et al. The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Arch Dermatol*. Dec 2007;143(12):1493-1499.
13. Boehncke WH, Schon MP. Psoriasis. *Lancet*. Sep 5 2015;386(9997):983-994.
14. Jiaravuthisan MM, Sasseville D, Vender RB, Murphy F, Muhn CY. Psoriasis of the nail: anatomy, pathology, clinical presentation, and a review of the literature on therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Jul 2007;57(1):1-27.
15. Tan ES, Chong WS, Tey HL. Nail psoriasis: a review. *American journal of clinical dermatology*. Dec 1 2012;13(6):375-388.
16. Gudjonsson JE, Karason A, Runarsdottir EH, et al. Distinct clinical differences between HLA-Cw\*0602 positive and negative psoriasis patients--an analysis of 1019 HLA-C- and HLA-B-typed patients. *The Journal of investigative dermatology*. Apr 2006;126(4):740-745.

## BIBLIOGRAFÍA

17. Prieto-Perez R, Solano-Lopez G, Cabaleiro T, et al. Polymorphisms Associated with Age at Onset in Patients with Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *J Immunol Res*. 2015;2015:101879.
18. Sugiura K. The genetic background of generalized pustular psoriasis: IL36RN mutations and CARD14 gain-of-function variants. *J Dermatol Sci*. Jun 2014;74(3):187-192.
19. Marrakchi S, Guigue P, Renshaw BR, et al. Interleukin-36-receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. *The New England journal of medicine*. Aug 18 2011;365(7):620-628.
20. Brunasso AMG, Massone C. Psoriasis and palmoplantar pustulosis: an endless debate? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. Jul 2017;31(7):e335-e337.
21. Setta-Kaffetzi N, Navarini AA, Patel VM, et al. Rare pathogenic variants in IL36RN underlie a spectrum of psoriasis-associated pustular phenotypes. *The Journal of investigative dermatology*. May 2013;133(5):1366-1369.
22. Lowes MA, Suarez-Farinas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annual review of immunology*. 2014;32:227-255.
23. Peter CM van de Kerkhof, Nestlé FO. Psoriasis. In: Jean L.Bologna, Joseph L. Jorizzo, Schaffer JC, eds. *Dermatology*. Vol 1. Third Edition ed: Elsevier.
24. Snast I, Reiter O, Atzmony L, et al. Psychological stress and psoriasis. A systematic review and meta-analysis. *The British journal of dermatology*. Nov 9 2017.
25. Ruiz-Romeu E, Ferran M, Sagrista M, et al. Streptococcus pyogenes-induced cutaneous lymphocyte antigen-positive T cell-dependent epidermal cell activation triggers TH17 responses in patients with guttate psoriasis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Aug 2016;138(2):491-499 e496.
26. Raychaudhuri SP, Jiang WY, Raychaudhuri SK. Revisiting the Koebner phenomenon: role of NGF and its receptor system in the pathogenesis of psoriasis. *Am J Pathol*. Apr 2008;172(4):961-971.
27. Elder JT, Nair RP, Voorhees JJ. Epidemiology and the genetics of psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. Jun 1994;102(6):24S-27S.
28. Capon F. The Genetic Basis of Psoriasis. *Int J Mol Sci*. Nov 25 2017;18(12).
29. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *American journal of human genetics*. May 2006;78(5):827-851.
30. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir A, et al. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw\*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *The British journal of dermatology*. Feb 2003;148(2):233-235.
31. Mabuchi T, Hirayama N. Binding Affinity and Interaction of LL-37 with HLA-C\*06:02 in Psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. Sep 2016;136(9):1901-1903.
32. Lande R, Botti E, Jandus C, et al. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nature communications*. 2014;5:5621.
33. Arakawa A, Siewert K, Stohr J, et al. Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *The Journal of experimental medicine*. Dec 14 2015;212(13):2203-2212.

34. Bonifacio KM, Kunjraiva N, Krueger JG, Fuentes-Duculan J. Cutaneous Expression of A Disintegrin-like and Metalloprotease domain containing Thrombospondin Type 1 motif-like 5 (ADAMTSL5) in Psoriasis goes beyond Melanocytes. *J Pigment Disord.* Oct 2016;3(3).
35. Fuentes-Duculan J, Bonifacio KM, Hawkes JE, et al. Autoantigens ADAMTSL5 and LL37 are significantly upregulated in active Psoriasis and localized with keratinocytes, dendritic cells and other leukocytes. *Exp Dermatol.* Nov 2017;26(11):1075-1082.
36. Valdimarsson H, Thorleifsdottir RH, Sigurdardottir SL, Gudjonsson JE, Johnston A. Psoriasis--as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol.* Oct 2009;30(10):494-501.
37. Clop A, Bertoni A, Spain SL, et al. An in-depth characterization of the major psoriasis susceptibility locus identifies candidate susceptibility alleles within an HLA-C enhancer element. *PLoS One.* 2013;8(8):e71690.
38. Jordan CT, Cao L, Roberson ED, et al. Rare and common variants in CARD14, encoding an epidermal regulator of NF-kappaB, in psoriasis. *American journal of human genetics.* May 4 2012;90(5):796-808.
39. Eskin-Schwartz M, Basel-Vanagaite L, David M, et al. Intra-familial Variation in Clinical Phenotype of CARD14-related Psoriasis. *Acta Derm Venereol.* Nov 2 2016;96(7):885-887.
40. Tanaka M, Kobiyama K, Honda T, et al. Essential Role of CARD14 in Murine Experimental Psoriasis. *Journal of immunology.* Jan 1 2018;200(1):71-81.
41. Oh IY, de Guzman Strong C. The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: EDC and Locus Control. *The Journal of investigative dermatology.* May 2017;137(5):e101-e104.
42. de Cid R, Riveira-Munoz E, Zeeuwen PL, et al. Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nature genetics.* Feb 2009;41(2):211-215.
43. Riveira-Munoz E, He SM, Escaramis G, et al. Meta-analysis confirms the LCE3C\_LCE3B deletion as a risk factor for psoriasis in several ethnic groups and finds interaction with HLA-Cw6. *The Journal of investigative dermatology.* May 2011;131(5):1105-1109.
44. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *American journal of human genetics.* Feb 2007;80(2):273-290.
45. Ellinghaus E, Ellinghaus D, Stuart PE, et al. Genome-wide association study identifies a psoriasis susceptibility locus at TRAF3IP2. *Nature genetics.* Nov 2010;42(11):991-995.
46. Nair RP, Duffin KC, Helms C, et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet.* Feb 2009;41(2):199-204.
47. Stuart PE, Nair RP, Ellinghaus E, et al. Genome-wide association analysis identifies three psoriasis susceptibility loci. *Nature genetics.* Nov 2010;42(11):1000-1004.
48. Genetic Analysis of Psoriasis C, the Wellcome Trust Case Control C, Strange A, et al. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat Genet.* Nov 2010;42(11):985-990.

## BIBLIOGRAFÍA

49. Yin X, Low HQ, Wang L, et al. Genome-wide meta-analysis identifies multiple novel associations and ethnic heterogeneity of psoriasis susceptibility. *Nature communications*. Apr 23 2015;6:6916.
50. Tsoi LC, Stuart PE, Tian C, et al. Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nature communications*. May 24 2017;8:15382.
51. Tsoi LC, Spain SL, Knight J, et al. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nat Genet*. Dec 2012;44(12):1341-1348.
52. Dand N, Mucha S, Tsoi LC, et al. Exome-wide association study reveals novel psoriasis susceptibility locus at TNFSF15 and rare protective alleles in genes contributing to type I IFN signalling. *Hum Mol Genet*. Nov 1 2017;26(21):4301-4313.
53. Greb JE, Goldminz AM, Elder JT, et al. Psoriasis. *Nature reviews. Disease primers*. Nov 24 2016;2:16082.
54. Onoufriadis A, Simpson MA, Pink AE, et al. Mutations in IL36RN/IL1F5 are associated with the severe episodic inflammatory skin disease known as generalized pustular psoriasis. *American journal of human genetics*. Sep 9 2011;89(3):432-437.
55. Navarini AA, Burden AD, Capon F, et al. European consensus statement on phenotypes of pustular psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. Nov 2017;31(11):1792-1799.
56. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*. May-Jun 2012;30(3):257-262.
57. Lee SH, Jeong SK, Ahn SK. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei medical journal*. Jun 30 2006;47(3):293-306.
58. Hoffjan S, Stemmler S. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *The British journal of dermatology*. Sep 2007;157(3):441-449.
59. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews. Molecular cell biology*. Apr 2005;6(4):328-340.
60. Jin L, Wang G. Keratin 17: a critical player in the pathogenesis of psoriasis. *Medicinal research reviews*. Mar 2014;34(2):438-454.
61. Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *The Journal of cell biology*. Feb 11 2008;180(3):451-458.
62. Lebre MC, van der Aar AM, van Baarsen L, et al. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *The Journal of investigative dermatology*. Feb 2007;127(2):331-341.
63. Kennedy-Crispin M, Billick E, Mitsui H, et al. Human keratinocytes' response to injury upregulates CCL20 and other genes linking innate and adaptive immunity. *The Journal of investigative dermatology*. Jan 2012;132(1):105-113.
64. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *The British journal of dermatology*. Nov 2008;159(5):1092-1102.

65. Takai T. TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. Mar 2012;61(1):3-17.
66. Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Wound healing: a paradigm for regeneration. *Mayo Clin Proc*. Sep 2013;88(9):1022-1031.
67. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. Jul 24 2008;454(7203):428-435.
68. Scrivo R, Vasile M, Bartosiewicz I, Valesini G. Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. *Autoimmunity reviews*. May 2011;10(7):369-374.
69. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends in immunology*. Mar 2011;32(3):110-116.
70. Murphy JE, Robert C, Kupper TS. Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. *The Journal of investigative dermatology*. Mar 2000;114(3):602-608.
71. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews*. Jan 2018;281(1):8-27.
72. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *The Journal of experimental medicine*. Jul 4 2005;202(1):135-143.
73. Albanesi C, Scarponi C, Pallotta S, et al. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *The Journal of experimental medicine*. Jan 16 2009;206(1):249-258.
74. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. Oct 4 2007;449(7162):564-569.
75. Lande R, Chamilos G, Ganguly D, et al. Cationic antimicrobial peptides in psoriatic skin cooperate to break innate tolerance to self-DNA. *European journal of immunology*. Jan 2015;45(1):203-213.
76. Cheung KL, Jarrett R, Subramaniam S, et al. Psoriatic T cells recognize neolipid antigens generated by mast cell phospholipase delivered by exosomes and presented by CD1a. *The Journal of experimental medicine*. Oct 17 2016;213(11):2399-2412.
77. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med*. Aug 31 2009;206(9):1983-1994.
78. Hivroz C, Chemin K, Tourret M, Bohineust A. Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(2):139-155.
79. Laggner U, Di Meglio P, Perera GK, et al. Identification of a novel proinflammatory human skin-homing Vgamma9Vdelta2 T cell subset with a potential role in psoriasis. *Journal of immunology*. Sep 1 2011;187(5):2783-2793.
80. Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity*. Aug 21 2009;31(2):321-330.

## BIBLIOGRAFÍA

81. Papotto PH, Reinhardt A, Prinz I, Silva-Santos B. Innately versatile: gammadelta17 T cells in inflammatory and autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity*. Dec 1 2017.
82. Eyerich K, Dimartino V, Cavani A. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. *European journal of immunology*. Apr 2017;47(4):607-614.
83. Diani M, Altomare G, Reali E. T cell responses in psoriasis and psoriatic arthritis. *Autoimmunity reviews*. Apr 2015;14(4):286-292.
84. Vollmer S, Menssen A, Prinz JC. Dominant lesional T cell receptor rearrangements persist in relapsing psoriasis but are absent from nonlesional skin: evidence for a stable antigen-specific pathogenic T cell response in psoriasis vulgaris. *The Journal of investigative dermatology*. Nov 2001;117(5):1296-1301.
85. Curran SA, FitzGerald OM, Costello PJ, et al. Nucleotide sequencing of psoriatic arthritis tissue before and during methotrexate administration reveals a complex inflammatory T cell infiltrate with very few clones exhibiting features that suggest they drive the inflammatory process by recognizing autoantigens. *Journal of immunology*. Feb 1 2004;172(3):1935-1944.
86. Cheuk S, Wiken M, Blomqvist L, et al. Epidermal Th22 and Tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis. *Journal of immunology*. Apr 1 2014;192(7):3111-3120.
87. Carrascosa JM, Vanaclocha F, Borrego L, et al. [Update of the topical treatment of psoriasis]. *Actas dermo-sifiliograficas*. Apr 2009;100(3):190-200.
88. Nast A, Gisondi P, Ormerod AD, et al. European S3-Guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris--Update 2015--Short version--EDF in cooperation with EADV and IPC. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. Dec 2015;29(12):2277-2294.
89. Dauden E, Puig L, Ferrandiz C, et al. Consensus document on the evaluation and treatment of moderate-to-severe psoriasis: Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. Mar 2016;30 Suppl 2:1-18.
90. Morita A. Current developments in phototherapy for psoriasis. *The Journal of dermatology*. Jan 25 2018.
91. Menter A, Korman NJ, Elmets CA, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 5. Guidelines of care for the treatment of psoriasis with phototherapy and photochemotherapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Jan 2010;62(1):114-135.
92. Archier E, Devaux S, Castela E, et al. Efficacy of psoralen UV-A therapy vs. narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: a systematic literature review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. May 2012;26 Suppl 3:11-21.
93. Archier E, Devaux S, Castela E, et al. Carcinogenic risks of psoralen UV-A therapy and narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: a

- systematic literature review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. May 2012;26 Suppl 3:22-31.
94. Chaudhari U, Romano P, Mulcahy LD, Dooley LT, Baker DG, Gottlieb AB. Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet*. Jun 9 2001;357(9271):1842-1847.
  95. Ogilvie AL, Antoni C, Dechant C, et al. Treatment of psoriatic arthritis with antitumour necrosis factor-alpha antibody clears skin lesions of psoriasis resistant to treatment with methotrexate. *The British journal of dermatology*. Mar 2001;144(3):587-589.
  96. Leonardi CL, Powers JL, Matheson RT, et al. Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *The New England journal of medicine*. Nov 20 2003;349(21):2014-2022.
  97. Gordon KB, Langley RG, Leonardi C, et al. Clinical response to adalimumab treatment in patients with moderate to severe psoriasis: double-blind, randomized controlled trial and open-label extension study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Oct 2006;55(4):598-606.
  98. Arora T, Padaki R, Liu L, et al. Differences in binding and effector functions between classes of TNF antagonists. *Cytokine*. Feb 2009;45(2):124-131.
  99. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics*. Feb 2008;117(2):244-279.
  100. Menter A, Gottlieb A, Feldman SR, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *Journal of the American Academy of Dermatology*. May 2008;58(5):826-850.
  101. Thomas SS, Borazan N, Barroso N, et al. Comparative Immunogenicity of TNF Inhibitors: Impact on Clinical Efficacy and Tolerability in the Management of Autoimmune Diseases. A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. Aug 2015;29(4):241-258.
  102. Dirks NL, Meibohm B. Population pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clinical pharmacokinetics*. Oct 2010;49(10):633-659.
  103. Wang W, Wang EQ, Balthasar JP. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical pharmacology and therapeutics*. Nov 2008;84(5):548-558.
  104. Keizer RJ, Huitema AD, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clinical pharmacokinetics*. Aug 2010;49(8):493-507.
  105. Puig L, Lopez-Ferrer A, Vilarrasa E, Garcia I, Fernandez-del Olmo R. Model for assessing the efficiency of biologic drugs in the treatment of moderate to severe psoriasis for one year in clinical practice in Spain. *Actas dermo-sifiliograficas*. Jan-Feb 2016;107(1):34-43.
  106. Janeway CA, Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*. Jan 1992;13(1):11-16.
  107. Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annual review of immunology*. 2007;25:419-441.

## BIBLIOGRAFÍA

108. de Koning HD, Rodijk-Olthuis D, van Vlijmen-Willems IM, et al. A comprehensive analysis of pattern recognition receptors in normal and inflamed human epidermis: upregulation of dectin-1 in psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. Nov 2010;130(11):2611-2620.
109. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. Oct 2009;9(10):679-691.
110. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. Mar 19 2010;140(6):805-820.
111. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. May 2010;11(5):373-384.
112. Spirig R, Tsui J, Shaw S. The Emerging Role of TLR and Innate Immunity in Cardiovascular Disease. *Cardiology research and practice*. 2012;2012:181394.
113. Chen JQ, Szodoray P, Zeher M. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*. Feb 2016;50(1):1-17.
114. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol*. Aug 2009;9(8):535-542.
115. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*. Mar 13 2008;452(7184):234-238.
116. Miyake K, Shibata T, Ohto U, et al. Mechanisms controlling nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *International immunology*. Mar 8 2018;30(2):43-51.
117. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature reviews. Immunology*. Aug 2015;15(8):471-485.
118. Kim S, Kaiser V, Beier E, et al. Self-priming determines high type I IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology*. Mar 2014;44(3):807-818.
119. Kiyokawa T, Akashi-Takamura S, Shibata T, et al. A single base mutation in the PRAT4A gene reveals differential interaction of PRAT4A with Toll-like receptors. *International immunology*. Nov 2008;20(11):1407-1415.
120. Shibata T, Takemura N, Motoi Y, et al. PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. *International immunology*. Oct 2012;24(10):613-623.
121. Yang Y, Liu B, Dai J, et al. Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity*. Feb 2007;26(2):215-226.
122. Majer O, Liu B, Barton GM. Nucleic acid-sensing TLRs: trafficking and regulation. *Current opinion in immunology*. Feb 2017;44:26-33.
123. Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nature immunology*. Nov 2009;10(11):1200-1207.
124. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *The Journal of clinical investigation*. Aug 2005;115(8):2223-2233.

125. Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *Journal of immunology*. Jun 15 2002;168(12):5989-5992.
126. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *The Journal of experimental medicine*. Apr 4 2005;201(7):1135-1143.
127. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature immunology*. Feb 2010;11(2):155-161.
128. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*. Nov 1 2002;298(5595):1025-1029.
129. Guiducci C, Gong M, Cepika AM, et al. RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. Dec 16 2013;210(13):2903-2919.
130. Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, et al. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity*. Nov 2007;27(5):801-810.
131. Schroder K, Lichtinger M, Irvine KM, et al. PU.1 and ICSBP control constitutive and IFN-gamma-regulated Tlr9 gene expression in mouse macrophages. *Journal of leukocyte biology*. Jun 2007;81(6):1577-1590.
132. Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest*. Feb 2005;115(2):407-417.
133. Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med*. Dec 5 2005;202(11):1575-1585.
134. Tian J, Avalos AM, Mao SY, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol*. May 2007;8(5):487-496.
135. Wenzel J, Tuting T. An IFN-associated cytotoxic cellular immune response against viral, self-, or tumor antigens is a common pathogenetic feature in "interface dermatitis". *The Journal of investigative dermatology*. Oct 2008;128(10):2392-2402.
136. Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity*. Dec 2003;19(6):837-847.
137. Kono DH, Baccala R, Theofilopoulos AN. TLRs and interferons: a central paradigm in autoimmunity. *Current opinion in immunology*. Dec 2013;25(6):720-727.
138. Kuznik A, Bencina M, Svajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *Journal of immunology*. Apr 15 2011;186(8):4794-4804.
139. Terhorst D, Kalali BN, Ollert M, Ring J, Mempel M. The role of toll-like receptors in host defenses and their relevance to dermatologic diseases. *American journal of clinical dermatology*. 2010;11(1):1-10.

## BIBLIOGRAFÍA

140. Baker BS, Ovigne JM, Powles AV, Corcoran S, Fry L. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *The British journal of dermatology*. Apr 2003;148(4):670-679.
141. Begon E, Michel L, Flageul B, et al. Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur J Dermatol*. Nov-Dec 2007;17(6):497-506.
142. Morizane S, Yamasaki K, Muhleisen B, et al. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *The Journal of investigative dermatology*. Jan 2012;132(1):135-143.
143. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of experimental medicine*. Sep 17 2001;194(6):863-869.
144. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature immunology*. Jan 2006;7(1):49-56.
145. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annual review of immunology*. 2011;29:163-183.
146. Honda K, Ohba Y, Yanai H, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature*. Apr 21 2005;434(7036):1035-1040.
147. Massot B, Michel ML, Diem S, et al. TLR-induced cytokines promote effective proinflammatory natural Th17 cell responses. *J Immunol*. Jun 15 2014;192(12):5635-5642.
148. Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, et al. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity*. Feb 24 2012;36(2):276-287.
149. He Z, Shotorbani SS, Jiao Z, et al. HMGB1 promotes the differentiation of Th17 via up-regulating TLR2 and IL-23 of CD14+ monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of immunology*. Nov 2012;76(5):483-490.
150. Manni M, Granstein RD, Maestroni G. beta2-Adrenergic agonists bias TLR-2 and NOD2 activated dendritic cells towards inducing an IL-17 immune response. *Cytokine*. Sep 2011;55(3):380-386.
151. Flutter B, Nestle FO. TLRs to cytokines: mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis. *Eur J Immunol*. Dec 2013;43(12):3138-3146.
152. Jiang W, Zhu FG, Bhagat L, et al. A Toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonist inhibits Th1 and Th17 responses and inflammasome activation in a model of IL-23-induced psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. Jul 2013;133(7):1777-1784.
153. Balak DM, van Doorn MB, Arbeit RD, et al. IMO-8400, a toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonist, demonstrates clinical activity in a phase 2a, randomized,

- placebo-controlled trial in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Clinical immunology*. Jan 2017;174:63-72.
154. Lai CY, Su YW, Lin KI, Hsu LC, Chuang TH. Natural Modulators of Endosomal Toll-Like Receptor-Mediated Psoriatic Skin Inflammation. *J Immunol Res*. 2017;2017:7807313.
  155. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature genetics*. Jun 2000;25(2):187-191.
  156. Skevaki C, Pararas M, Kostelidou K, Tsakris A, Routsias JG. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. *Clin Exp Immunol*. May 2015;180(2):165-177.
  157. Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol*. Jun 2012;13(6):535-542.
  158. Bochud PY, Hawn TR, Aderem A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *Journal of immunology*. Apr 1 2003;170(7):3451-3454.
  159. Xiong Y, Song C, Snyder GA, Sundberg EJ, Medvedev AE. R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88. *The Journal of biological chemistry*. Nov 2 2012;287(45):38327-38337.
  160. Ranjith-Kumar CT, Miller W, Sun J, et al. Effects of single nucleotide polymorphisms on Toll-like receptor 3 activity and expression in cultured cells. *The Journal of biological chemistry*. Jun 15 2007;282(24):17696-17705.
  161. Yang HY, Lee HS, Lee CH, et al. Association of a functional polymorphism in the promoter region of TLR-3 with osteoarthritis: a two-stage case-control study. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. May 2013;31(5):680-685.
  162. Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T. Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *The Journal of biological chemistry*. Nov 23 2012;287(48):40611-40617.
  163. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, et al. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *The Journal of experimental medicine*. Nov 17 2003;198(10):1563-1572.
  164. Moller-Larsen S, Nyegaard M, Haagerup A, Vestbo J, Kruse TA, Borglum AD. Association analysis identifies TLR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders. *Thorax*. Dec 2008;63(12):1064-1069.
  165. Kikuchi K, Lian ZX, Kimura Y, et al. Genetic polymorphisms of toll-like receptor 9 influence the immune response to CpG and contribute to hyper-IgM in primary biliary cirrhosis. *Journal of autoimmunity*. Jun 2005;24(4):347-352.
  166. Fischer J, Weber ANR, Bohm S, et al. Sex-specific effects of TLR9 promoter variants on spontaneous clearance of HCV infection. *Gut*. Oct 2017;66(10):1829-1837.

## BIBLIOGRAFÍA

167. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between toll-like receptor polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update. *Lupus*. May 2016;25(6):593-601.
168. Liu Y, Yin H, Zhao M, Lu Q. TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. Oct 2014;47(2):136-147.
169. Davis MLR, LeVan TD, Yu F, et al. Associations of toll-like receptor (TLR)-4 single nucleotide polymorphisms and rheumatoid arthritis disease progression: an observational cohort study. *International immunopharmacology*. Feb 2015;24(2):346-352.
170. Gebura K, Swierkot J, Wysoczanska B, et al. Polymorphisms within Genes Involved in Regulation of the NF-kappaB Pathway in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. Jul 4 2017;18(7).
171. Nadeem A, Siddiqui N, Al-Harbi NO, Al-Harbi MM, Ahmad SF. TLR-7 agonist attenuates airway reactivity and inflammation through Nrf2-mediated antioxidant protection in a murine model of allergic asthma. *The international journal of biochemistry & cell biology*. Apr 2016;73:53-62.
172. Hossain MJ, Tanasescu R, Gran B. Innate immune regulation of autoimmunity in multiple sclerosis: Focus on the role of Toll-like receptor 2. *Journal of neuroimmunology*. Mar 15 2017;304:11-20.
173. Broen JC, Bossini-Castillo L, van Bon L, et al. A rare polymorphism in the gene for Toll-like receptor 2 is associated with systemic sclerosis phenotype and increases the production of inflammatory mediators. *Arthritis and rheumatism*. Jan 2012;64(1):264-271.
174. O'Reilly S. Toll Like Receptors in systemic sclerosis: An emerging target. *Immunology letters*. Mar 2018;195:2-8.
175. Smith RL, Hebert HL, Massey J, et al. Association of Toll-like receptor 4 (TLR4) with chronic plaque type psoriasis and psoriatic arthritis. *Archives of dermatological research*. Apr 2016;308(3):201-205.
176. Shi G, Wang T, Li S, et al. TLR2 and TLR4 polymorphisms in Southern Chinese Psoriasis Vulgaris patients. *J Dermatol Sci*. Aug 2016;83(2):145-147.
177. Zablotna M, Sobjanek M, Purzycka-Bohdan D, Szczerkowska-Dobosz A, Nedoszytko B, Nowicki RJ. The significance of Toll-like receptor (TLR) 2 and 9 gene polymorphisms in psoriasis. *Postępy dermatologii i alergologii*. Feb 2017;34(1):85-86.
178. Soldevila G, Raman C, Lozano F. The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. *Current opinion in immunology*. Jun 2011;23(3):310-318.
179. Consuegra-Fernandez M, Martinez-Florensa M, Aranda F, et al. Relevance of CD6-Mediated Interactions in the Regulation of Peripheral T-Cell Responses and Tolerance. *Frontiers in immunology*. 2017;8:594.
180. Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature reviews. Immunology*. Sep 2013;13(9):621-634.
181. Bowen MA, Whitney GS, Neubauer M, et al. Structure and chromosomal location of the human CD6 gene: detection of five human CD6 isoforms. *Journal of immunology*. Feb 1 1997;158(3):1149-1156.

182. Lozano F, Simarro M, Calvo J, et al. CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling. *Critical reviews in immunology*. 2000;20(4):347-358.
183. Vasquez M, Simoes I, Consuegra-Fernandez M, Aranda F, Lozano F, Berraondo P. Exploiting scavenger receptors in cancer immunotherapy: Lessons from CD5 and SR-B1. *European journal of immunology*. Jul 2017;47(7):1108-1118.
184. Orta-Mascaro M, Consuegra-Fernandez M, Carreras E, et al. CD6 modulates thymocyte selection and peripheral T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine*. Jul 25 2016;213(8):1387-1397.
185. Boyse EA, Old LJ, Stockert E. An approach to the mapping of antigens on the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jul 1968;60(3):886-893.
186. Flaherty L, Zimmerman D. Surface mapping of mouse thymocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Apr 1979;76(4):1990-1993.
187. Kamoun M, Kadin ME, Martin PJ, Nettleton J, Hansen JA. A novel human T cell antigen preferentially expressed on mature T cells and shared by both well and poorly differentiated B cell leukemias and lymphomas. *Journal of immunology*. Sep 1981;127(3):987-991.
188. Aruffo A, Melnick MB, Linsley PS, Seed B. The lymphocyte glycoprotein CD6 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted proteins. *The Journal of experimental medicine*. Oct 1 1991;174(4):949-952.
189. Simoes IT, Aranda F, Carreras E, et al. Immunomodulatory effects of soluble CD5 on experimental tumor models. *Oncotarget*. Dec 8 2017;8(64):108156-108169.
190. Li Y, Singer NG, Whitbred J, Bowen MA, Fox DA, Lin F. CD6 as a potential target for treating multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Mar 7 2017;114(10):2687-2692.
191. Dogra S, Uprety S, Suresh SH. Itolizumab, a novel anti-CD6 monoclonal antibody: a safe and efficacious biologic agent for management of psoriasis. *Expert opinion on biological therapy*. Mar 2017;17(3):395-402.
192. Krupashankar DS, Dogra S, Kura M, et al. Efficacy and safety of itolizumab, a novel anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase-III study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Sep 2014;71(3):484-492.
193. Rodriguez PC, Prada DM, Moreno E, et al. The anti-CD6 antibody itolizumab provides clinical benefit without lymphopenia in rheumatoid arthritis patients: results from a 6-month, open-label Phase I clinical trial. *Clinical and experimental immunology*. Feb 2018;191(2):229-239.
194. Chopra A, Chandrashekar S, Iyer R, et al. Itolizumab in combination with methotrexate modulates active rheumatoid arthritis: safety and efficacy from a phase 2, randomized, open-label, parallel-group, dose-ranging study. *Clinical rheumatology*. Apr 2016;35(4):1059-1064.

## BIBLIOGRAFÍA

195. Le Dantec C, Alonso R, Fali T, et al. Rationale for treating primary Sjogren's syndrome patients with an anti-CD6 monoclonal antibody (Itolizumab). *Immunologic research*. Jul 2013;56(2-3):341-347.
196. Sarrias MR, Gronlund J, Padilla O, Madsen J, Holmskov U, Lozano F. The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Critical reviews in immunology*. 2004;24(1):1-37.
197. Consuegra-Fernandez M, Aranda F, Simoes I, Orta M, Sarukhan A, Lozano F. CD5 as a Target for Immune-Based Therapies. *Critical reviews in immunology*. 2015;35(2):85-115.
198. Mizoguchi A, Mizoguchi E, de Jong YP, et al. Role of the CD5 molecule on TCR gammadelta T cell-mediated immune functions: development of germinal centers and chronic intestinal inflammation. *International immunology*. Jan 2003;15(1):97-108.
199. Ordóñez-Rueda D, Lozano F, Sarukhan A, Raman C, García-Zepeda EA, Soldevila G. Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *European journal of immunology*. Aug 2009;39(8):2233-2247.
200. Hippen KL, Tze LE, Behrens TW. CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *The Journal of experimental medicine*. Mar 6 2000;191(5):883-890.
201. Aparicio-Siegmund S, Deseke M, Lickert A, Garbers C. Trans-signaling of interleukin-6 (IL-6) is mediated by the soluble IL-6 receptor, but not by soluble CD5. *Biochemical and biophysical research communications*. Mar 18 2017;484(4):808-812.
202. Zhang C, Xin H, Zhang W, et al. CD5 Binds to Interleukin-6 and Induces a Feed-Forward Loop with the Transcription Factor STAT3 in B Cells to Promote Cancer. *Immunity*. Apr 19 2016;44(4):913-923.
203. Vera J, Fenutria R, Canadas O, et al. The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Feb 3 2009;106(5):1506-1511.
204. Sarhan MA, Pham TN, Chen AY, Michalak TI. Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5. *Journal of virology*. Apr 2012;86(7):3723-3735.
205. Alberola-Ila J, Places L, Cantrell DA, Vives J, Lozano F. Intracellular events involved in CD5-induced human T cell activation and proliferation. *Journal of immunology*. Mar 1 1992;148(5):1287-1293.
206. Tarakhovsky A, Kanner SB, Hombach J, et al. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science*. Jul 28 1995;269(5223):535-537.
207. Bikah G, Carey J, Ciallella JR, Tarakhovsky A, Bondada S. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science*. Dec 13 1996;274(5294):1906-1909.
208. Azzam HS, DeJarnette JB, Huang K, et al. Fine tuning of TCR signaling by CD5. *Journal of immunology*. May 1 2001;166(9):5464-5472.
209. Garaud S, Le Dantec C, Berthou C, Lydyard PM, Youinou P, Renaudineau Y. Selection of the alternative exon 1 from the cd5 gene down-regulates

- membrane level of the protein in B lymphocytes. *Journal of immunology*. Aug 1 2008;181(3):2010-2018.
210. Sestero CM, McGuire DJ, De Sarno P, et al. CD5-dependent CK2 activation pathway regulates threshold for T cell anergy. *Journal of immunology*. Sep 15 2012;189(6):2918-2930.
  211. de Wit J, Souwer Y, van Beelen AJ, et al. CD5 costimulation induces stable Th17 development by promoting IL-23R expression and sustained STAT3 activation. *Blood*. Dec 1 2011;118(23):6107-6114.
  212. McGuire DJ, Rowse AL, Li H, et al. CD5 enhances Th17-cell differentiation by regulating IFN-gamma response and RORgammat localization. *European journal of immunology*. Apr 2014;44(4):1137-1142.
  213. Axtell RC, Webb MS, Barnum SR, Raman C. Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice. *Journal of immunology*. Sep 1 2004;173(5):2928-2932.
  214. Friedlein G, El Hage F, Vergnon I, et al. Human CD5 protects circulating tumor antigen-specific CTL from tumor-mediated activation-induced cell death. *Journal of immunology*. Jun 1 2007;178(11):6821-6827.
  215. Mier-Aguilar CA, Cashman KS, Raman C, Soldevila G. CD5-CK2 Signaling Modulates Erk Activation and Thymocyte Survival. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168155.
  216. Axtell RC, Xu L, Barnum SR, Raman C. CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system. *Journal of immunology*. Dec 15 2006;177(12):8542-8549.
  217. Perez-Chacon G, Vargas JA, Jorda J, et al. CD5 provides viability signals to B cells from a subset of B-CLL patients by a mechanism that involves PKC. *Leukemia research*. Feb 2007;31(2):183-193.
  218. Hawiger D, Masilamani RF, Bettelli E, Kuchroo VK, Nussenzweig MC. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity*. Jun 2004;20(6):695-705.
  219. Henderson JG, Opejin A, Jones A, Gross C, Hawiger D. CD5 instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens. *Immunity*. Mar 17 2015;42(3):471-483.
  220. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. May 2008;28(5):639-650.
  221. Sellebjerg F, Jensen CV, Christiansen M. Intrathecal IgG synthesis and autoantibody-secreting cells in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. Aug 1 2000;108(1-2):207-215.
  222. Hara M, Kitani A, Hirose T, et al. Stimulatory effect of CD5 antibody on B cells from patients with rheumatoid arthritis. *Clinical immunology and immunopathology*. Nov 1988;49(2):223-230.
  223. Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. *Journal of immunology*. Apr 1 2009;182(7):4116-4126.

## BIBLIOGRAFÍA

224. Genit MC, Martinez-Florensa M, Consuegra M, et al. Analysis of ancestral and functionally relevant CD5 variants in systemic lupus erythematosus patients. *PLoS One*. 2014;9(11):e113090.
225. Corrales JJ, Orfao A, Lopez A, Mories MT, Miralles JM, Ciudad J. CD5+ B cells in Graves' disease: correlation with disease activity. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. Jun 1996;28(6):280-285.
226. Lorini R, Avanzini MA, Vitali L. Follow-up of anti-beta-lactoglobulin antibodies in children with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. Jul 1993;36(7):683-684.
227. Burastero SE, Lo Pinto G, Goletti D, Cutolo M, Burlando L, Falagiani P. Rheumatoid arthritis with monoclonal IgE rheumatoid factor. *The Journal of rheumatology*. Mar 1993;20(3):489-494.
228. Cantaert T, Doorenspleet ME, Francosalinas G, et al. Increased numbers of CD5+ B lymphocytes with a regulatory phenotype in spondylarthritis. *Arthritis and rheumatism*. Jun 2012;64(6):1859-1868.
229. Burastero SE, Cutolo M, Dessi V, Celada F. Monoreactive and polyreactive rheumatoid factors produced by in vitro Epstein-Barr virus-transformed peripheral blood and synovial B lymphocytes from rheumatoid arthritis patients. *Scandinavian journal of immunology*. Oct 1990;32(4):347-357.
230. Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M, et al. High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology*. Sep 2001;40(9):1056-1059.
231. Noh G, Lozano F. Intravenous immune globulin effects on serum-soluble CD5 levels in atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. Dec 2001;31(12):1932-1938.
232. Aibar J, Martinez-Florensa M, Castro P, et al. Pattern of soluble CD5 and CD6 lymphocyte receptors in critically ill patients with septic syndromes. *Journal of critical care*. Oct 2015;30(5):914-919.
233. Fenutria R, Martinez VG, Simoes I, et al. Transgenic expression of soluble human CD5 enhances experimentally-induced autoimmune and anti-tumoral immune responses. *PLoS One*. 2014;9(1):e84895.
234. Carnero-Montoro E, Bonet L, Engelken J, et al. Evolutionary and functional evidence for positive selection at the human CD5 immune receptor gene. *Molecular biology and evolution*. Feb 2012;29(2):811-823.
235. Moreno-Estrada A, Tang K, Sikora M, et al. Interrogating 11 fast-evolving genes for signatures of recent positive selection in worldwide human populations. *Molecular biology and evolution*. Oct 2009;26(10):2285-2297.
236. Eyre S, Bowes J, Diogo D, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nature genetics*. Dec 2012;44(12):1336-1340.
237. Miles K, Simpson J, Brown S, Cowan G, Gray D, Gray M. Immune Tolerance to Apoptotic Self Is Mediated Primarily by Regulatory B1a Cells. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1952.
238. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *The New England journal of medicine*. Oct 27 2011;365(17):1612-1623.

239. Skyler JS, Lorenz TJ, Schwartz S, et al. Effects of an anti-CD5 immunoconjugate (CD5-plus) in recent onset type I diabetes mellitus: a preliminary investigation. The CD5 Diabetes Project Team. *Journal of diabetes and its complications*. Oct-Dec 1993;7(4):224-232.
240. Stafford FJ, Fleisher TA, Lee G, et al. A pilot study of anti-CD5 ricin A chain immunoconjugate in systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*. Nov 1994;21(11):2068-2070.
241. Cannon GW, Marble DA, Griffiths MM, et al. Immunologic assessment during treatment of rheumatoid arthritis with anti-CD5 immunoconjugate. *The Journal of rheumatology*. Feb 1995;22(2):207-213.
242. Wacholtz MC, Lipsky PE. Treatment of lupus nephritis with CD5 PLUS, an immunoconjugate of an anti-CD5 monoclonal antibody and ricin A chain. *Arthritis and rheumatism*. Jul 1992;35(7):837-839.
243. Martinez VG, Moestrup SK, Holmskov U, Mollenhauer J, Lozano F. The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis. *Pharmacological reviews*. Dec 2011;63(4):967-1000.
244. Olsen NJ, Brooks RH, Cush JJ, et al. A double-blind, placebo-controlled study of anti-CD5 immunoconjugate in patients with rheumatoid arthritis. The Xoma RA Investigator Group. *Arthritis and rheumatism*. Jul 1996;39(7):1102-1108.
245. Antin JH, Bierer BE, Smith BR, et al. Selective depletion of bone marrow T lymphocytes with anti-CD5 monoclonal antibodies: effective prophylaxis for graft-versus-host disease in patients with hematologic malignancies. *Blood*. Oct 15 1991;78(8):2139-2149.
246. Filipovich AH, Vallera D, McGlave P, et al. T cell depletion with anti-CD5 immunotoxin in histocompatible bone marrow transplantation. The correlation between residual CD5 negative T cells and subsequent graft-versus-host disease. *Transplantation*. Sep 1990;50(3):410-415.
247. Bonet L, Farnos M, Martinez-Florensa M, Martinez VG, Lozano F. Identification of functionally relevant phosphorylatable serine clusters in the cytoplasmic region of the human CD6 lymphocyte surface receptor. *FEBS letters*. Jul 11 2013;587(14):2205-2213.
248. Ibanez A, Sarrias MR, Farnos M, et al. Mitogen-activated protein kinase pathway activation by the CD6 lymphocyte surface receptor. *Journal of immunology*. Jul 15 2006;177(2):1152-1159.
249. Kobarg J, Whitney GS, Palmer D, Aruffo A, Bowen MA. Analysis of the tyrosine phosphorylation and calcium fluxing of human CD6 isoforms with different cytoplasmic domains. *European journal of immunology*. Nov 1997;27(11):2971-2980.
250. Breuning J, Brown MH. T Cell Costimulation by CD6 Is Dependent on Bivalent Binding of a GADS/SLP-76 Complex. *Molecular and cellular biology*. Jun 1 2017;37(11).
251. Gimferrer I, Ibanez A, Farnos M, et al. The lymphocyte receptor CD6 interacts with syntenin-1, a scaffolding protein containing PDZ domains. *Journal of immunology*. Aug 1 2005;175(3):1406-1414.
252. Hem CD, Ekornhol M, Granum S, Sundvold-Gjerstad V, Spurkland A. CD6 and Linker of Activated T Cells are Potential Interaction Partners for T Cell-

## BIBLIOGRAFÍA

- Specific Adaptor Protein. *Scandinavian journal of immunology*. Feb 2017;85(2):104-112.
253. Consuegra-Fernandez M, Lin F, Fox DA, Lozano F. Clinical and experimental evidence for targeting CD6 in immune-based disorders. *Autoimmunity reviews*. May 2018;17(5):493-503.
254. Carrasco E, Escoda-Ferran C, Climent N, et al. Human CD6 Down-Modulation following T-Cell Activation Compromises Lymphocyte Survival and Proliferative Responses. *Frontiers in immunology*. 2017;8:769.
255. Sarukhan A, Martinez-Florensa M, Escoda-Ferran C, Carrasco E, Carreras E, Lozano F. Pattern Recognition by CD6: A Scavenger-Like Lymphocyte Receptor. *Current drug targets*. 2016;17(6):640-650.
256. Bowen MA, Patel DD, Li X, et al. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *The Journal of experimental medicine*. Jun 1 1995;181(6):2213-2220.
257. Chappell PE, Garner LI, Yan J, et al. Structures of CD6 and Its Ligand CD166 Give Insight into Their Interaction. *Structure*. Aug 4 2015;23(8):1426-1436.
258. Enyindah-Asonye G, Li Y, Ruth JH, et al. CD318 is a ligand for CD6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Aug 15 2017;114(33):E6912-E6921.
259. Sarrias MR, Farnos M, Mota R, et al. CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jul 10 2007;104(28):11724-11729.
260. Martinez-Florensa M, Consuegra-Fernandez M, Martinez VG, et al. Targeting of key pathogenic factors from gram-positive bacteria by the soluble ectodomain of the scavenger-like lymphocyte receptor CD6. *The Journal of infectious diseases*. Apr 1 2014;209(7):1077-1086.
261. Escoda-Ferran C, Carrasco E, Caballero-Banos M, et al. Modulation of CD6 function through interaction with Galectin-1 and -3. *FEBS letters*. Aug 25 2014;588(17):2805-2813.
262. Gimferrer I, Calvo M, Mittelbrunn M, et al. Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *Journal of immunology*. Aug 15 2004;173(4):2262-2270.
263. Hassan NJ, Simmonds SJ, Clarkson NG, et al. CD6 regulates T-cell responses through activation-dependent recruitment of the positive regulator SLP-76. *Molecular and cellular biology*. Sep 2006;26(17):6727-6738.
264. Zimmerman AW, Joosten B, Torensma R, Parnes JR, van Leeuwen FN, Figdor CG. Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood*. Apr 15 2006;107(8):3212-3220.
265. Saifullah MK, Fox DA, Sarkar S, et al. Expression and characterization of a novel CD6 ligand in cells derived from joint and epithelial tissues. *Journal of immunology*. Nov 15 2004;173(10):6125-6133.
266. Joo YS, Singer NG, Endres JL, et al. Evidence for the expression of a second CD6 ligand by synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. Feb 2000;43(2):329-335.

267. Santos RF, Oliveira L, Carmo AM. Tuning T Cell Activation: The Function of CD6 At the Immunological Synapse and in T Cell Responses. *Current drug targets*. 2016;17(6):630-639.
268. Roncagalli R, Hauri S, Fiore F, et al. Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub. *Nature immunology*. Apr 2014;15(4):384-392.
269. Nair P, Melarkode R, Rajkumar D, Montero E. CD6 synergistic co-stimulation promoting proinflammatory response is modulated without interfering with the activated leucocyte cell adhesion molecule interaction. *Clinical and experimental immunology*. Oct 2010;162(1):116-130.
270. Osorio LM, Garcia CA, Jondal M, Chow SC. The anti-CD6 mAb, IOR-T1, defined a new epitope on the human CD6 molecule that induces greater responsiveness in T cell receptor/CD3-mediated T cell proliferation. *Cellular immunology*. Mar 1994;154(1):123-133.
271. Gangemi RM, Swack JA, Gaviria DM, Romain PL. Anti-T12, an anti-CD6 monoclonal antibody, can activate human T lymphocytes. *Journal of immunology*. Oct 15 1989;143(8):2439-2447.
272. Oliveira MI, Goncalves CM, Pinto M, et al. CD6 attenuates early and late signaling events, setting thresholds for T-cell activation. *European journal of immunology*. Jan 2012;42(1):195-205.
273. Cayrol R, Wosik K, Berard JL, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nature immunology*. Feb 2008;9(2):137-145.
274. Levesque MC, Heinly CS, Whichard LP, Patel DD. Cytokine-regulated expression of activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166) on monocyte-lineage cells and in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis and rheumatism*. Dec 1998;41(12):2221-2229.
275. Singer NG, Fox DA, Haqqi TM, et al. CD6: expression during development, apoptosis and selection of human and mouse thymocytes. *International immunology*. Jun 2002;14(6):585-597.
276. Wang JE, Dahle MK, McDonald M, Foster SJ, Aasen AO, Thiemermann C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock*. Nov 2003;20(5):402-414.
277. Lenz LL. CD5 sweetens lymphocyte responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Feb 3 2009;106(5):1303-1304.
278. Enyindah-Asonye G, Li Y, Xin W, et al. CD6 Receptor Regulates Intestinal Ischemia/Reperfusion-induced Injury by Modulating Natural IgM-producing B1a Cell Self-renewal. *The Journal of biological chemistry*. Jan 13 2017;292(2):661-671.
279. Stanley KT, VanDort C, Motyl C, Endres J, Fox DA. Immunocompetent properties of human osteoblasts: interactions with T lymphocytes. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Jan 2006;21(1):29-36.
280. Montero E, Falcon L, Morera Y, Delgado J, Amador JF, Perez R. CD6 molecule may be important in the pathological mechanisms of lymphocytes adhesion

## BIBLIOGRAFÍA

- to human skin in psoriasis and IOR-T1 MAb a possible new approach to treat this disease. *Autoimmunity*. 1999;29(2):155-156.
281. Kofler DM, Severson CA, Mousissian N, De Jager PL, Hafler DA. The CD6 multiple sclerosis susceptibility allele is associated with alterations in CD4+ T cell proliferation. *Journal of immunology*. Sep 15 2011;187(6):3286-3291.
  282. Swaminathan B, Cuapio A, Alloza I, et al. Fine mapping and functional analysis of the multiple sclerosis risk gene CD6. *PLoS One*. 2013;8(4):e62376.
  283. Jurewicz A, Zaleski K, Domowicz M, Selmaj K. High CD6 and low chemokine receptor expression on peripheral blood lymphocytes correlates with MRI gadolinium enhancement in MS. *Journal of neuroimmunology*. Nov 15 2014;276(1-2):187-194.
  284. Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. Dec 2009;132(Pt 12):3329-3341.
  285. Wagner M, Bilinska M, Pokryszko-Dragan A, et al. ALCAM and CD6--multiple sclerosis risk factors. *Journal of neuroimmunology*. Nov 15 2014;276(1-2):98-103.
  286. Zheng M, Zhang L, Yu H, et al. Genetic polymorphisms of cell adhesion molecules in Behcet's disease in a Chinese Han population. *Scientific reports*. Apr 25 2016;6:24974.
  287. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. Nov 1 2012;491(7422):119-124.
  288. Allison MC, Poulter LW, Dhillon AP, Pounder RE. Immunohistological studies of surface antigen on colonic lymphoid cells in normal and inflamed mucosa. Comparison of follicular and lamina propria lymphocytes. *Gastroenterology*. Aug 1990;99(2):421-430.
  289. Kirkman RL, Araujo JL, Busch GJ, et al. Treatment of acute renal allograft rejection with monoclonal anti-T12 antibody. *Transplantation*. Dec 1983;36(6):620-626.
  290. Reinherz EL, Geha R, Rappeport JM, et al. Reconstitution after transplantation with T-lymphocyte-depleted HLA haplotype-mismatched bone marrow for severe combined immunodeficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Oct 1982;79(19):6047-6051.
  291. Mateo C, Lombardero J, Moreno E, et al. Removal of amphipathic epitopes from genetically engineered antibodies: production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity. *Hybridoma*. Dec 2000;19(6):463-471.
  292. Srivastava A. Itolizumab in Psoriasis. *Indian journal of dermatology*. Jul-Aug 2017;62(4):418-421.
  293. Hernandez P, Moreno E, Aira LE, Rodriguez PC. Therapeutic Targeting of CD6 in Autoimmune Diseases: A Review of Cuban Clinical Studies with the Antibodies IOR-T1 and Itolizumab. *Current drug targets*. 2016;17(6):666-677.

294. Parthasaradhi A, Singh V, Parasramani SG, et al. A Real-World Study to Assess the Effectiveness of Itolizumab in Patients with Chronic Plaque Psoriasis. *Indian dermatology online journal*. Jul-Aug 2017;8(4):246-249.
295. Singh V. Clinical Outcome of a Novel Anti-CD6 Biologic Itolizumab in Patients of Psoriasis with Comorbid Conditions. *Dermatology research and practice*. 2016;2016:1316326.
296. Aira LE, Lopez-Requena A, Fuentes D, et al. Immunological and histological evaluation of clinical samples from psoriasis patients treated with anti-CD6 itolizumab. *mAbs*. May-Jun 2014;6(3):783-793.
297. Menon R, David BG. Itolizumab - a humanized anti-CD6 monoclonal antibody with a better side effects profile for the treatment of psoriasis. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2015;8:215-222.
298. Bughani U, Saha A, Kuriakose A, et al. T cell activation and differentiation is modulated by a CD6 domain 1 antibody Itolizumab. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180088.
299. Gupta A, Sharma YK, Deo K, Kothari P. Severe recalcitrant psoriasis treated with itolizumab, a novel anti-CD6 monoclonal antibody. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*. Jul-Aug 2016;82(4):459-461.
300. Rodriguez PC, Torres-Moya R, Reyes G, et al. A clinical exploratory study with itolizumab, an anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis. *Results in immunology*. 2012;2:204-211.
301. Aira LE, Hernandez P, Prada D, et al. Immunological evaluation of rheumatoid arthritis patients treated with itolizumab. *mAbs*. 2016;8(1):187-195.
302. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews. Immunology*. Jan 2008;8(1):34-47.
303. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunological reviews*. Jul 2010;236:265-275.
304. Ravetch J. In vivo veritas: the surprising roles of Fc receptors in immunity. *Nature immunology*. Mar 2010;11(3):183-185.
305. Bazilio AP, Viana VS, Toledo R, Woronik V, Bonfa E, Monteiro RC. Fc gamma RIIa polymorphism: a susceptibility factor for immune complex-mediated lupus nephritis in Brazilian patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. Jun 2004;19(6):1427-1431.
306. Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JP, Fc gamma R-SLEm-ai. The Fc gamma RIIIA-F158 allele is a risk factor for the development of lupus nephritis: a meta-analysis. *Kidney international*. Apr 2003;63(4):1475-1482.
307. Lee YH, Bae SC, Song GG. FCGR2A, FCGR3A, FCGR3B polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clinical and experimental rheumatology*. Sep-Oct 2015;33(5):647-654.
308. Karassa FB, Bijl M, Davies KA, et al. Role of the Fcγ receptor IIA polymorphism in the antiphospholipid syndrome: an international meta-analysis. *Arthritis and rheumatism*. Jul 2003;48(7):1930-1938.
309. Domingo P, Muniz-Diaz E, Baraldes MA, et al. Associations between Fc gamma receptor IIA polymorphisms and the risk and prognosis of meningococcal disease. *The American journal of medicine*. Jan 2002;112(1):19-25.

## BIBLIOGRAFÍA

310. Munde EO, Okeyo WA, Raballah E, et al. Association between Fcγ receptor IIA, IIIA and IIIB genetic polymorphisms and susceptibility to severe malaria anemia in children in western Kenya. *BMC infectious diseases*. Apr 20 2017;17(1):289.
311. Song GG, Lee YH. Associations between FCGR2A rs1801274, FCGR3A rs396991, FCGR3B NA1/NA2 polymorphisms and periodontitis: a meta-analysis. *Molecular biology reports*. Aug 2013;40(8):4985-4993.
312. Liu D, Tian Y, Sun D, Sun H, Jin Y, Dong M. The FCGR3A polymorphism predicts the response to rituximab-based therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis. *Annals of hematology*. Sep 2016;95(9):1483-1490.
313. Gavin PG, Song N, Kim SR, et al. Association of Polymorphisms in FCGR2A and FCGR3A With Degree of Trastuzumab Benefit in the Adjuvant Treatment of ERBB2/HER2-Positive Breast Cancer: Analysis of the NSABP B-31 Trial. *JAMA oncology*. Mar 1 2017;3(3):335-341.
314. Liu G, Tu D, Lewis M, et al. Fc-gamma Receptor Polymorphisms, Cetuximab Therapy, and Survival in the NCIC CTG CO.17 Trial of Colorectal Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. May 15 2016;22(10):2435-2444.
315. Lee YH, Bae SC. Associations between PTPRC rs10919563 A/G and FCGR2A R131H polymorphisms and responsiveness to TNF blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology international*. Jun 2016;36(6):837-844.
316. Louis E, El Ghoul Z, Vermeire S, et al. Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. Mar 1 2004;19(5):511-519.
317. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γ<sub>3</sub> complex. *Nature*. Jul 20 2000;406(6793):267-273.
318. Bruhns P, Jonsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunological reviews*. Nov 2015;268(1):25-51.
319. Trinchieri G, Valiante N. Receptors for the Fc fragment of IgG on natural killer cells. *Natural immunity*. Jul-Oct 1993;12(4-5):218-234.
320. Lisi S, Sisto M, Lofrumento DD, D'Amore S, D'Amore M. Advances in the understanding of the Fc γ receptors-mediated autoantibodies uptake. *Clinical and experimental medicine*. Mar 2011;11(1):1-10.
321. Simtong P, Romphruk AV, Traum A, et al. Molecular and Functional Characterization of Fcγ Receptor IIb-Ligand Interaction: Implications for Neutrophil-Mediated Immune Mechanisms in Malaria. *Infection and immunity*. Aug 2018;86(8).
322. Chen K, Nishi H, Travers R, et al. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIb but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood*. Nov 22 2012;120(22):4421-4431.
323. Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M, Mayadas TN. Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity*. Jun 2008;28(6):833-846.

324. Espeli M, Niederer HA, Traherne JA, Trowsdale J, Smith KG. Genetic variation, Fcγ receptors, KIRs and infection: the evolution of autoimmunity. *Current opinion in immunology*. Dec 2010;22(6):715-722.
325. van der Poel CE, Spaapen RM, van de Winkel JG, Leusen JH. Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, FcγRI. *Journal of immunology*. Mar 1 2011;186(5):2699-2704.
326. Marois L, Pare G, Vaillancourt M, Rollet-Labelle E, Naccache PH. FcγRIIIb triggers raft-dependent calcium influx in IgG-mediated responses in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. Feb 4 2011;286(5):3509-3519.
327. Bruhns P, Iannascoli B, England P, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. Apr 16 2009;113(16):3716-3725.
328. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*. Jan 2006;24(1):19-28.
329. Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, FcγRI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-γ. *Journal of immunology*. Apr 15 2000;164(8):4332-4339.
330. Atkinson JP. C5a and Fcγ receptors: a mutual admiration society. *The Journal of clinical investigation*. Feb 2006;116(2):304-306.
331. Liu Y, Masuda E, Blank MC, et al. Cytokine-mediated regulation of activating and inhibitory Fcγ receptors in human monocytes. *Journal of leukocyte biology*. May 2005;77(5):767-776.
332. Tridandapani S, Wardrop R, Baran CP, et al. TGF-β1 suppresses [correction of supresses] myeloid Fcγ receptor function by regulating the expression and function of the common γ-subunit. *Journal of immunology*. May 1 2003;170(9):4572-4577.
333. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual review of immunology*. 2007;25:21-50.
334. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. Aug 4 2006;313(5787):670-673.
335. Pawlowski JW, Bajardi-Taccioli A, Houde D, Feschenko M, Carlage T, Kaltashov IA. Influence of glycan modification on IgG1 biochemical and biophysical properties. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. Jan 3 2018;151:133-144.
336. van der Heijden J, Nagelkerke S, Zhao X, et al. Haplotypes of FcγRIIa and FcγRIIIb polymorphic variants influence IgG-mediated responses in neutrophils. *Journal of immunology*. Mar 15 2014;192(6):2715-2721.
337. Gerber JS, Mosser DM. Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fcγ receptors. *Microbes and infection*. Feb 2001;3(2):131-139.
338. Marquez ME, Millet C, Stekman H, et al. CD16 cross-linking induces increased expression of CD56 and production of IL-12 in peripheral NK cells. *Cellular immunology*. 2010;264(1):86-92.

## BIBLIOGRAFÍA

339. Cassard L, Jonsson F, Arnaud S, Daeron M. Fcγ receptors inhibit mouse and human basophil activation. *Journal of immunology*. Sep 15 2012;189(6):2995-3006.
340. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, et al. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *The Journal of experimental medicine*. Jan 18 1999;189(2):371-380.
341. Boruchov AM, Heller G, Veri MC, Bonvini E, Ravetch JV, Young JW. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *The Journal of clinical investigation*. Oct 2005;115(10):2914-2923.
342. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. *Advances in immunology*. 2007;96:179-204.
343. Dijkstra HM, Bijl M, Fijnheer R, et al. Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis and rheumatism*. Dec 2000;43(12):2793-2800.
344. van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG. FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue antigens*. Mar 2003;61(3):189-202.
345. Forthall DN, Landucci G, Bream J, Jacobson LP, Phan TB, Montoya B. FcγRIIIa genotype predicts progression of HIV infection. *Journal of immunology*. Dec 1 2007;179(11):7916-7923.
346. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, et al. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *The Journal of clinical investigation*. Sep 1 1997;100(5):1059-1070.
347. Taylor RJ, Chan SL, Wood A, et al. FcγRIIIa polymorphisms and cetuximab induced cytotoxicity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. Jul 2009;58(7):997-1006.
348. Lopez-Albaitero A, Lee SC, Morgan S, et al. Role of polymorphic Fc γ receptor IIIa and EGFR expression level in cetuximab mediated, NK cell dependent in vitro cytotoxicity of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. Nov 2009;58(11):1853-1864.
349. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer research*. Jul 1 2004;64(13):4664-4669.
350. Hatjiharissi E, Xu L, Santos DD, et al. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the FcγRIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood*. Oct 1 2007;110(7):2561-2564.
351. Willcocks LC, Smith KG, Clatworthy MR. Low-affinity Fcγ receptors, autoimmunity and infection. *Expert reviews in molecular medicine*. Aug 13 2009;11:e24.
352. Brown EE, Edberg JC, Kimberly RP. Fc receptor genes and the systemic lupus erythematosus diathesis. *Autoimmunity*. Dec 2007;40(8):567-581.

353. Zhu XW, Wang Y, Wei YH, et al. Comprehensive Assessment of the Association between FCGRs polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: Evidence from a Meta-Analysis. *Scientific reports*. Aug 19 2016;6:31617.
354. International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus G, Harley JB, Alarcon-Riquelme ME, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nature genetics*. Feb 2008;40(2):204-210.
355. Li R, Peng H, Chen GM, et al. Association of FCGR2A-R/H131 polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus among Asian population: a meta-analysis of 20 studies. *Archives of dermatological research*. Nov 2014;306(9):781-791.
356. Li LH, Yuan H, Pan HF, Li WX, Li XP, Ye DQ. Role of the Fcγ receptor IIIA-V/F158 polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Scandinavian journal of rheumatology*. Mar 2010;39(2):148-154.
357. Dai M, Zhou Z, Wang X, Qian X, Huang X. Association of FcγRIIIa-158V/F with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *International journal of rheumatic diseases*. Dec 2013;16(6):685-691.
358. Li X, Ptacek TS, Brown EE, Edberg JC. Fcγ receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes and immunity*. Jul 2009;10(5):380-389.
359. Gillis C, Gouel-Cheron A, Jonsson F, Bruhns P. Contribution of Human FcγRIIIa to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Frontiers in immunology*. 2014;5:254.
360. Kastbom A, Ahmadi A, Soderkvist P, Skogh T. The 158V polymorphism of Fcγ receptor type IIIA in early rheumatoid arthritis: increased susceptibility and severity in male patients (the Swedish TIRA project). *Rheumatology*. Oct 2005;44(10):1294-1298.
361. Xu J, Zhao L, Zhang Y, Guo Q, Chen H. CD16 and CD32 Gene Polymorphisms May Contribute to Risk of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. Jun 18 2016;22:2086-2096.
362. van der Pol WL, Jansen MD, Kuks JB, et al. Association of the Fcγ receptor IIA-R/R131 genotype with myasthenia gravis in Dutch patients. *Journal of neuroimmunology*. Nov 2003;144(1-2):143-147.
363. Amdahl C, Alseth EH, Gilhus NE, Nakkestad HL, Skeie GO. Polygenic disease associations in thymomatous myasthenia gravis. *Archives of neurology*. Dec 2007;64(12):1729-1733.
364. Weersma RK, Crusius JB, Roberts RL, et al. Association of FcγR2a, but not FcγR3a, with inflammatory bowel diseases across three Caucasian populations. *Inflammatory bowel diseases*. Dec 2010;16(12):2080-2089.
365. Asano K, Matsushita T, Umeno J, et al. A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population. *Nature genetics*. Dec 2009;41(12):1325-1329.
366. McGovern DP, Gardet A, Torkvist L, et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nature genetics*. Apr 2010;42(4):332-337.

## BIBLIOGRAFÍA

367. Alizadeh BZ, Valdigem G, Coenen MJ, et al. Association analysis of functional variants of the FcgRIIa and FcgRIIIa genes with type 1 diabetes, celiac disease and rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet.* Nov 1 2007;16(21):2552-2559.
368. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood.* Feb 1 2002;99(3):754-758.
369. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* Nov 1 2003;21(21):3940-3947.
370. Kim DH, Jung HD, Kim JG, et al. FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* Oct 15 2006;108(8):2720-2725.
371. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, et al. Polymorphisms in FcgammaRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* Jan 20 2005;23(3):474-481.
372. Ghesquieres H, Larrabee BR, Haioun C, et al. FCGR3A/2A polymorphisms and diffuse large B-cell lymphoma outcome treated with immunochemotherapy: a meta-analysis on 1134 patients from two prospective cohorts. *Hematological oncology.* Dec 2017;35(4):447-455.
373. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, et al. Impact of Fc{gamma}RIIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* Mar 1 2009;27(7):1122-1129.
374. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, et al. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* Aug 20 2007;25(24):3712-3718.
375. Magnes T, Melchardt T, Hufnagl C, et al. The influence of FCGR2A and FCGR3A polymorphisms on the survival of patients with recurrent or metastatic squamous cell head and neck cancer treated with cetuximab. *The pharmacogenomics journal.* Jul 18 2017.
376. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* Apr 10 2008;26(11):1789-1796.
377. Mellor JD, Brown MP, Irving HR, Zalcborg JR, Dobrovic A. A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *Journal of hematology & oncology.* Jan 4 2013;6:1.

378. Moroi R, Endo K, Kinouchi Y, et al. FCGR3A-158 polymorphism influences the biological response to infliximab in Crohn's disease through affecting the ADCC activity. *Immunogenetics*. Apr 2013;65(4):265-271.
379. Louis EJ, Watier HE, Schreiber S, et al. Polymorphism in IgG Fc receptor gene FCGR3A and response to infliximab in Crohn's disease: a subanalysis of the ACCENT I study. *Pharmacogenetics and genomics*. Dec 2006;16(12):911-914.
380. Ternant D, Berkane Z, Picon L, et al. Assessment of the Influence of Inflammation and FCGR3A Genotype on Infliximab Pharmacokinetics and Time to Relapse in Patients with Crohn's Disease. *Clinical pharmacokinetics*. May 2015;54(5):551-562.
381. Romero-Cara P, Torres-Moreno D, Pedregosa J, et al. A FCGR3A Polymorphism Predicts Anti-drug Antibodies in Chronic Inflammatory Bowel Disease Patients Treated With Anti-TNF. *International journal of medical sciences*. 2018;15(1):10-15.
382. Tomita K, Chiba T, Sugai T, Habano W. Association between tumor necrosis factor-alpha and Fc-gamma receptor polymorphisms with infliximab in Crohn's disease. *Hepato-gastroenterology*. May-Jun 2010;57(99-100):535-539.
383. Tutuncu Z, Kavanaugh A, Zvaifler N, Corr M, Deutsch R, Boyle D. Fc gamma receptor type IIIA polymorphisms influence treatment outcomes in patients with inflammatory arthritis treated with tumor necrosis factor alpha-blocking agents. *Arthritis and rheumatism*. Sep 2005;52(9):2693-2696.
384. Canete JD, Suarez B, Hernandez MV, et al. Influence of variants of Fc gamma receptors IIA and IIIA on the American College of Rheumatology and European League Against Rheumatism responses to anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. Oct 2009;68(10):1547-1552.
385. Avila-Pedretti G, Tornero J, Fernandez-Nebro A, et al. Variation at FCGR2A and functionally related genes is associated with the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122088.
386. Montes A, Perez-Pampin E, Narvaez J, et al. Association of FCGR2A with the response to infliximab treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics and genomics*. May 2014;24(5):238-245.
387. Davila-Fajardo CL, van der Straaten T, Baak-Pablo R, et al. FcGR genetic polymorphisms and the response to adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2015;16(4):373-381.
388. Morales-Lara MJ, Conesa-Zamora P, Garcia-Simon MS, et al. Association between the FCGR3A V158F polymorphism and the clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Scandinavian journal of rheumatology*. Nov 2010;39(6):518-520.
389. Ramirez J, Fernandez-Sueiro JL, Lopez-Mejias R, et al. FCGR2A/CD32A and FCGR3A/CD16A variants and EULAR response to tumor necrosis factor-alpha blockers in psoriatic arthritis: a longitudinal study with 6 months of followup. *The Journal of rheumatology*. May 2012;39(5):1035-1041.
390. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between functional FCGR2A R131H and FCGR3A F158V polymorphisms and responsiveness to TNF

- blockers in spondyloarthritis, psoriasis and Crohn's disease: a meta-analysis. *Pharmacogenomics*. Aug 2016;17(13):1465-1477.
391. Batalla A, Coto E, Coto-Segura P. Influence of Fcγ Receptor Polymorphisms on Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Treatment in Psoriasis. *JAMA dermatology*. Dec 1 2015;151(12):1376-1378.
392. Prieto-Perez R, Solano-Lopez G, Cabaleiro T, et al. New polymorphisms associated with response to anti-TNF drugs in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *The pharmacogenomics journal*. Jan 2018;18(1):70-75.
393. Langley RG, Krueger GG, Griffiths CE. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Annals of the rheumatic diseases*. Mar 2005;64 Suppl 2:ii18-23; discussion ii24-15.
394. Ferrandiz C, Pujol RM, Garcia-Patos V, Bordas X, Smandia JA. Psoriasis of early and late onset: a clinical and epidemiologic study from Spain. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Jun 2002;46(6):867-873.
395. Swindell WR, Michaels KA, Sutter AJ, et al. Imiquimod has strain-dependent effects in mice and does not uniquely model human psoriasis. *Genome medicine*. Mar 9 2017;9(1):24.
396. Julia M, Consuegra-Fernandez M, Guilabert A, et al. Genetically defined variants of toll-like receptors 3, 7 and 9 as phenotype and risk modifier factors for psoriasis. *J Dermatol Sci*. Mar 2018;89(3):301-304.
397. Nahum A, Dadi H, Bates A, Roifman CM. The biological significance of TLR3 variant, L412F, in conferring susceptibility to cutaneous candidiasis, CMV and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. Mar 2012;11(5):341-347.
398. Cooke G, Kamal I, Strengert M, et al. Toll-like receptor 3 L412F polymorphism promotes a persistent clinical phenotype in pulmonary sarcoidosis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. Apr 1 2018;111(4):217-224.
399. Dhiman N, Ovsyannikova IG, Vierkant RA, et al. Associations between SNPs in toll-like receptors and related intracellular signaling molecules and immune responses to measles vaccine: preliminary results. *Vaccine*. Mar 25 2008;26(14):1731-1736.
400. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR)-9 promoter polymorphisms and atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Feb 2006;364(1-2):303-307.
401. Chen KH, Zeng L, Gu W, Zhou J, Du DY, Jiang JX. Polymorphisms in the toll-like receptor 9 gene associated with sepsis and multiple organ dysfunction after major blunt trauma. *The British journal of surgery*. Sep 2011;98(9):1252-1259.
402. Roszak A, Lianeri M, Sowinska A, Jagodzinski PP. Involvement of Toll-like Receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. *Molecular biology reports*. Aug 2012;39(8):8425-8430.
403. Nikamo P, Cheuk S, Lysell J, et al. Genetic variants of the IL22 promoter associate to onset of psoriasis before puberty and increased IL-22 production in T cells. *The Journal of investigative dermatology*. Jun 2014;134(6):1535-1541.

404. Lysell J, Padyukov L, Kockum I, Nikamo P, Stahle M. Genetic association with ERAP1 in psoriasis is confined to disease onset after puberty and not dependent on HLA-C\*06. *The Journal of investigative dermatology*. Feb 2013;133(2):411-417.
405. Smith RL, Warren RB, Eyre S, et al. Polymorphisms in the IL-12beta and IL-23R genes are associated with psoriasis of early onset in a UK cohort. *The Journal of investigative dermatology*. May 2008;128(5):1325-1327.
406. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature reviews. Immunology*. Aug 2008;8(8):594-606.
407. Wang MX, Zhao JX, Meng YJ, et al. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid inhibits the secretion of cytokines by dendritic cells via the TLR7/8 pathway in an imiquimod-induced psoriasis mouse model and in vitro. *Life sciences*. Aug 15 2018;207:90-104.
408. Togni S, Maramaldi G, Di Pierro F, Biondi M. A cosmeceutical formulation based on boswellic acids for the treatment of erythematous eczema and psoriasis. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2014;7:321-327.
409. Puig L, Bordas X, Carrascosa JM, et al. [Consensus document on the evaluation and treatment of moderate-to-severe psoriasis. Spanish psoriasis group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology]. *Actas Dermosifiliogr*. May 2009;100(4):277-286.
410. Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *JAMA*. Oct 11 2006;296(14):1735-1741.
411. Kurd SK, Troxel AB, Crits-Christoph P, Gelfand JM. The risk of depression, anxiety, and suicidality in patients with psoriasis: a population-based cohort study. *Arch Dermatol*. Aug 2010;146(8):891-895.
412. Ahlehoff O, Skov L, Gislason G, et al. Cardiovascular disease event rates in patients with severe psoriasis treated with systemic anti-inflammatory drugs: a Danish real-world cohort study. *Journal of internal medicine*. Feb 2013;273(2):197-204.
413. Ryan C, Renfro L, Collins P, Kirby B, Rogers S. Clinical and genetic predictors of response to narrowband ultraviolet B for the treatment of chronic plaque psoriasis. *The British journal of dermatology*. Nov 2010;163(5):1056-1063.
414. DeSilva B, McKenzie RC, Hunter JA, Norval M. Local effects of TL01 phototherapy in psoriasis. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. Oct 2008;24(5):268-269.
415. Carrascosa JM, Lopez-Estebarez JL, Carretero G, et al. [Narrowband UV-B, monochromatic excimer laser, and photodynamic therapy in psoriasis: a consensus statement of the Spanish Psoriasis Group]. *Actas dermo-sifiliograficas*. Apr 2011;102(3):175-186.
416. Kirke SM, Lowder S, Lloyd JJ, Diffey BL, Matthews JN, Farr PM. A randomized comparison of selective broadband UVB and narrowband UVB in the treatment of psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. Jul 2007;127(7):1641-1646.

## BIBLIOGRAFÍA

417. Fortune DG, Richards HL, Kirby B, et al. Psychological distress impairs clearance of psoriasis in patients treated with photochemotherapy. *Arch Dermatol.* Jun 2003;139(6):752-756.
418. Coimbra S, Oliveira H, Belo L, Figueiredo A, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A. Principal determinants of the length of remission of psoriasis vulgaris after topical, NB-UVB, and PUVA therapy: a follow-up study. *American journal of clinical dermatology.* Feb 2013;14(1):49-53.
419. Smith G, Wilkie MJ, Deeni YY, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) genotype influences erythematous sensitivity to psoralen-ultraviolet A photochemotherapy. *The British journal of dermatology.* Dec 2007;157(6):1230-1234.
420. Smith G, Weidlich S, Dawe RS, Ibbotson SH. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) genotype but not GSTT1 or MC1R genotype influences erythematous sensitivity to narrow band (TL-01) UVB phototherapy. *Pharmacogenetics and genomics.* Apr 2011;21(4):217-224.
421. Tao K, Fujii M, Tsukumo S, et al. Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *Annals of the rheumatic diseases.* Jul 2007;66(7):905-909.
422. Tartar D, Bhutani T, Huynh M, Berger T, Koo J. Update on the immunological mechanism of action behind phototherapy. *Journal of drugs in dermatology : JDD.* May 2014;13(5):564-568.
423. Dai ZH, Tan B, Yang H, Wang O, Qian JM, Lv H. 1,25-hydroxyvitamin D relieves colitis in rats via down-regulation of toll-like receptor 9 expression. *Croatian medical journal.* Dec 2015;56(6):515-524.
424. Dickie LJ, Church LD, Coulthard LR, Mathews RJ, Emery P, McDermott MF. Vitamin D3 down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes. *Rheumatology.* Aug 2010;49(8):1466-1471.
425. Suzuki T, Tatsuno K, Ito T, Sakabe JI, Funakoshi A, Tokura Y. Distinctive downmodulation of plasmacytoid dendritic cell functions by vitamin D3 analogue calcipotriol. *J Dermatol Sci.* Oct 2016;84(1):71-79.
426. Yazdanpanah E, Mahmoudi M, Sahebari M, et al. Vitamin D3 Alters the Expression of Toll-like Receptors in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of cellular biochemistry.* Dec 2017;118(12):4831-4835.
427. Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *The Journal of experimental medicine.* Jul 1 2013;210(7):1369-1387.
428. Castro MA, Oliveira MI, Nunes RJ, et al. Extracellular isoforms of CD6 generated by alternative splicing regulate targeting of CD6 to the immunological synapse. *Journal of immunology.* Apr 1 2007;178(7):4351-4361.
429. Krintel SB, Essioux L, Wool A, et al. CD6 and syntaxin binding protein 6 variants and response to tumor necrosis factor alpha inhibitors in Danish patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2012;7(6):e38539.

430. Kofler DM, Farkas A, von Bergwelt-Baildon M, Hafler DA. The Link Between CD6 and Autoimmunity: Genetic and Cellular Associations. *Current drug targets*. 2016;17(6):651-665.
431. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunological reviews*. Jun 2008;223:87-113.
432. Fantuzzi F, Del Giglio M, Gisondi P, Girolomoni G. Targeting tumor necrosis factor alpha in psoriasis and psoriatic arthritis. *Expert opinion on therapeutic targets*. Sep 2008;12(9):1085-1096.
433. Nishio S, Yamamoto T, Kaneko K, et al. Pharmacokinetic study and Fcgamma receptor gene analysis in two patients with rheumatoid arthritis controlled by low-dose infliximab. *Modern rheumatology*. 2009;19(3):329-333.
434. Montes A, Perez-Pampin E, Joven B, et al. FCGR polymorphisms in the treatment of rheumatoid arthritis with Fc-containing TNF inhibitors. *Pharmacogenomics*. 2015;16(4):333-345.
435. Bek S, Bojesen AB, Nielsen JV, et al. Systematic review and meta-analysis: pharmacogenetics of anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis. *The pharmacogenomics journal*. Oct 2017;17(5):403-411.
436. Mendrinou E, Patsatsi A, Zafiriou E, et al. FCGR3A-V158F polymorphism is a disease-specific pharmacogenetic marker for the treatment of psoriasis with Fc-containing TNFalpha inhibitors. *The pharmacogenomics journal*. Jun 2017;17(3):237-241.
437. Lejeune J, Thibault G, Ternant D, Cartron G, Watier H, Ohresser M. Evidence for linkage disequilibrium between Fcgamma RIIIa-V158F and Fcgamma RIIa-H131R polymorphisms in white patients, and for an Fcgamma RIIIa-restricted influence on the response to therapeutic antibodies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. Nov 20 2008;26(33):5489-5491; author reply 5491-5482.
438. Liu L, Lu J, Allan BW, et al. Generation and characterization of ixekizumab, a humanized monoclonal antibody that neutralizes interleukin-17A. *Journal of inflammation research*. 2016;9:39-50.
439. Sondermann P, Szymkowski DE. Harnessing Fc receptor biology in the design of therapeutic antibodies. *Current opinion in immunology*. Jun 2016;40:78-87.
440. Brezski RJ, Georgiou G. Immunoglobulin isotype knowledge and application to Fc engineering. *Current opinion in immunology*. Jun 2016;40:62-69.



## **ANEXOS**

---



**VIII. ANEXO I**

- Publicación Original 1 “Genetically defined variants of toll-like receptors 3, 7 and 9 as phenotype and risk modifier factors for Psoriasis.”
- Publicación Original 2: “Toll-like receptor 9 promoter polymorphism as a predictive factor of narrow-band UVB phototherapy response in patients with Psoriasis.”
- Publicación Original 3: “Genetic and experimental evidence for the involvement of the CD6 lymphocyte receptor in Psoriasis.”
- Publicación Original 4: “The role of Fcγ receptor polymorphisms in the response to anti-tumor necrosis factor therapy in Psoriasis: A pharmacogenetic study.”



## Artículo original nº 1

### “Genetically defined variants of toll-like receptors 3, 7 and 9 as phenotype and risk modifier factors for Psoriasis.”

Julià M<sup>1,2</sup>, Consuegra-Fernández M<sup>3</sup>, Guilabert A<sup>4</sup>, Muñoz C<sup>4</sup>, Esteve A<sup>5</sup>, Armiger-Borràs N<sup>3</sup>, Santiago F<sup>3</sup>, Arias MT<sup>3</sup>, Romaní J<sup>6</sup>, Ferrándiz C<sup>7</sup>, Carrascosa JM<sup>7</sup>, Pedrosa E<sup>8,9</sup>, Alsina-Gibert M<sup>2</sup>, Lozano F<sup>3,10,11</sup>, Mascaró-Galy JM<sup>7</sup>.

**Journal of Dermatologic Science 2018; 89:301-304.**

1. Servicio de Dermatología, Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, Spain;
2. Servei de Dermatologia, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.
3. Immunoreceptores del Sistema Innat i Adaptatiu, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.
4. Servei de Dermatologia, Hospital General de Granollers, Barcelona, Spain.
5. Registre Hospitalari de Tumors, Hospital Germans Trias i Pujol. Institut Català d'Oncologia, Badalona, Spain.
6. Servei de Dermatologia, Consorci Sanitari Parc Taulí, Autonomous University of Barcelona, Sabadell, Spain.
7. Servei de Dermatologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain.
8. Laboratori d'Immunobiologia per Investigació i Aplicacions al Diagnòstic, Banc de Sang i Teixits (BST), Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol.
9. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.
10. Departament de Biomedicina, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.
11. Servei d'Immunologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.

Factor de impacto año 2017: 3.675

Ranking 11/142 en su área de conocimiento, Dermatología (1º cuartil).





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Dermatological Science

journal homepage: [www.jdsjournal.com](http://www.jdsjournal.com)

### Genetically defined variants of toll-like receptors 3, 7 and 9 as phenotype and risk modifier factors for psoriasis

To the Editor,

In psoriasis, a chronic inflammatory skin disease with a complex pathophysiology, multiple epidermal differentiation and immune-related genes interact with environmental factors [1]. Despite recent findings on pathogenic related-immune cellular subsets and cytokines (e.g. Th17 and Th22 pathways), the ultimate factors that trigger and preserve inflammation remain unknown. TLRs are germ line-encoded pattern-recognition receptors that recognize pathogen-associated and molecular patterns (PAMPs) and tissue damage-associated molecular patterns (DAMPs) such as self-nucleic acids. These receptors, expressed by immune and non-professional immune cells (i.e. keratinocytes), constitute a main immune sensing system that induces rapid inflammatory responses. Abnormal TLR function is related to chronic inflammatory and autoimmune diseases [2]. In psoriasis, TLRs are involved in *i*) triggering psoriasis-related cytokine secretion on keratinocytes after PAMP/DAMP-induced activation, *ii*) dendritic cell (DC) activation elicited by self-DNA-LL-37 complexes via TLR7, TLR8 and TLR9, breaking immune-tolerance [3], and *iii*) IL-23/Th17 axis promotion inducing IL-23 production in DCs and macrophages [4].

To explore the role of TLRs in psoriasis, we analysed 11 single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Table 1) in 304 Spanish psoriasis patients and 305 healthy controls. Inclusion criteria were age  $\geq 18$  years and a follow-up of  $\geq 6$  months. The ethics committee approved the study protocol and all patients gave written informed consent before inclusion and blood extraction for TLR genotyping. Patients who received  $\geq 1$  systemic treatment, biological agents or phototherapy, were included in the moderate-to-severe group, according to previous studies [5]. The age at disease onset was dichotomized as  $< 40$  years (early-onset psoriasis) vs.  $\geq 40$  years (late onset psoriasis), a cut-off used in previous studies [6].

Table 1 shows the clinical and demographic characteristics of the study population. Clinical features were compared according to psoriasis severity. Genetic data analysis showed all SNPs analysed were in HWE ( $p > 0.05$ ) except TLR9 rs5743836, which was in disequilibrium only in the patient group ( $p = 0.02$ ), suggesting a possible association with psoriasis. Linkage disequilibrium (LD) analysis was made between SNPs of the same gene and found high LD between TLR3, TLR4 and TLR9 SNPs.

We investigated whether any TLR SNP studied acted as a psoriasis susceptibility genetic factor by comparing genetic data of psoriasis patients and controls. There were significant differences for TLR9 rs5743836; specifically, the homozygous CC genotype was more frequent in patients (2.3% vs. 0%;  $p = 0.0278$ ), in agreement with the disequilibrium observed in the HWE analysis and suggesting a potential association between the CC genotype and psoriasis (Table 2).

Potential associations between allelic and genotypic frequencies of all TLR SNPs and psoriasis severity, the presence of PsA and age at disease onset were assessed. Only TLR7 rs179008 showed a trend to greater disease severity ( $p = 0.0440$ ) but was not significant in the multivariate analysis. The T allele and the pooled AT+TT genotype of TLR7 rs179008 SNP were significantly associated with PsA in the univariate analysis and multivariate analyses adjusted for sex, age at disease onset, disease duration, family history and PASI values ( $p = 0.0121$  and  $p = 0.0344$ , respectively) (Table 2). According to age of disease onset, significant associations were found between the TLR3 rs3775291 polymorphism and early-onset psoriasis (Table 2). Heterozygous genotypes of TLR9 rs187084 and rs352140 SNPs were significantly associated with early-onset psoriasis in a dominant inheritance pattern ( $p = 0.0067$  and  $p = 0.0346$ , respectively) (Table 2). Despite the high LD between TLR9 SNPs, haplotype analysis showed no relevant results.

We examined TLR polymorphisms as susceptibility and disease-modifying genetic factors in psoriasis. Few recent articles have investigated this issue [7–9]. Smith et al. and Shi et al. focused on TLR2 and TLR4 and showed contradictory results [7–9],[7–9]. Zablorna et al. reported similar results although few TLR2 and TLR9 SNPs were analysed [9]. We expanded the analysis to multiple SNPs of many relevant TLRs, specifically including SNPs of intracellular nucleic acid-sensing TLRs (TLR3, TLR7 and TLR9) believed to play a key role in psoriasis, and the most-studied cell-surface TLRs (TLR2 and TLR4). We found no relevant role for the TLR2 and TLR4 SNPs studied in psoriasis susceptibility, in contrast to previous reports [7–9],[7–9]. Genetic differences in the populations studied might explain the contradictory results [7–9]. We also found a significant association between the TLR9 rs5743836 polymorphism and psoriasis. Surprisingly, Zablorna et al. linked TLR9 rs5743836 with a more severe and earlier psoriasis onset [9]. To our knowledge, this is the first study linking TLR9 rs5743836 SNP to psoriasis susceptibility.

As a disease-modifying genetic factor, the hypomorphic TLR7 rs179008 polymorphism was significantly associated with psoriasis severity, but not in the multivariate analysis. However, it was significantly associated with PsA, despite a very high confounding variable adjustment. Although TLR7 is known to play a role in DC activation, which drives the inflammatory cascade in psoriasis, no specific role has been postulated in PsA, as it has in rheumatoid arthritis [10]. The most notable findings were regarding the age at onset of psoriasis. First, there was an association between TLR3 rs3775291 and early-onset psoriasis in the univariate and multivariate analyses. This SNP has been related to a hypomorphic form that down-regulates receptor inflammatory activity although how it contributes to an earlier onset of psoriasis is not clear and is beyond the scope of this work. Secondly, the mutated alleles of the TLR9 rs187084 and rs352140 polymorphisms were associated with early-onset psoriasis in a dominant pattern of inheritance. Zablorna et al. observed a significant association between the TLR9 rs5743836 polymorphism and more severe and earlier

<https://doi.org/10.1016/j.jderm.2017.12.004>

0923-1811/© 2017 Japanese Society for Investigative Dermatology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: M. Julià, et al., Genetically defined variants of toll-like receptors 3, 7 and 9 as phenotype and risk modifier factors for psoriasis, J Dermatol Sci (2017), <https://doi.org/10.1016/j.jderm.2017.12.004>

**Table 1**  
Toll-like receptor polymorphisms analysed and clinical and demographic characteristics of study population.

SNP ID	Gene	Chr	Location	Nucleotide change	Amino acid change	Functional impact on receptor
rs121917864	TLR2	4	Exon 2	c.2029C > T	p.R677W	Hypomorphic
rs5743708			Exon 2	c.2258G > A	p.R753Q	Hypomorphic
rs3775291	TLR3	4	Exon 4	c.1234C > T	p.L412F	Hypomorphic
rs3775296			5' UT	c.-7C > A	untranslated	Increase transcriptional activity
rs4986790	TLR4	9	Exon 4	c.896A > G	p.D299G	Hypomorphic
rs4986791			Exon 4	c.1196C > T	p.T399I	Hypomorphic
rs5744168	TLR5	1	Exon 6	c.1174C > T	p.R392 > Stop	Amorphic
rs179008	TLR7	X	Exon 3	c.32A > T	p.Q11L	Hypomorphic
rs352140	TLR9	3	Exon 2	c.2848G > A	p.P545P	Increase transcriptional activity
rs5743836			5' UT	c.-1237T > C	untranslated	Increase transcriptional activity
rs187084			5'UT	c.-1486T > C	untranslated	Increase transcriptional activity

Study population	Mild psoriasis		Moderate-to-severe psoriasis		All		p**
	n	%	n	%	n	%	
n	115	37.8	189	62.2	304	100	
Age (years) <sup>†</sup>	53	[41–67]	48	[37–61]	50	[38–63]	<b>0.0427</b>
Gender							
Male	62	54	119	63	181	59.5	0.1503
Female	53	46	70	37	123	40.5	
Age of disease onset (years) <sup>†</sup>	31	[19–51]	25	[16–35]	27	[18–41]	<b>0.0007</b>
Age <40 years at disease onset	64	59.8	135	77.6	199	70.8	<b>0.0023</b>
Disease duration (years) <sup>†</sup>	13	[8–24]	19.5	[12–30]	18	[10–28]	<b>0.0056</b>
Family history	53	47.3	83	50	136	48.9	0.7521
Psoriatic arthritis	8	7	39	20.7	47	15.5	<b>0.0023</b>
Psoriasis subtype							0.7979
Vulgar	121	89	16	84.2	137	88.4	
Guttata	7	5.2	2	10.5	9	5.8	
Palmoplantar	7	5.2	1	5.3	8	5.2	
Inverse	1	1	0	0	1	0.6	
PASI	<7	100	87	43	23	47.3	< <b>0.0001</b>
	>7	15	13	144	77	159	52.6

Abbreviations: PASI = psoriasis area severity index.

<sup>†</sup> Median and interquartile ranges [IQR].<sup>\*\*</sup> Comparisons of continuous variables between groups were performed using the Kruskal-Wallis test: the chi square test was used to compare frequencies.**Table 2**  
Intracellular nucleic-sensing TLR3, TLR7 and TLR9 genotype analysis with respect to PsA and age of disease onset.

Gene	SNP ID	Genotype	No PsA (n = 164)		PsA (n = 117)		Univariate		Multivariate <sup>†</sup>	
			n	%	n	%	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
TLR7	rs179008	AA	183	73	28	62	1	–	1	–
		AT	37	15	7	16	1.236 (0.502–3.043)	0.6440	2.452 (0.768–7.651)	0.1223
		TT	29	12	10	22	2.254 (0.991–5.125)	0.0525	2.234 (0.828–6.027)	0.1125
		AT+TT	66	27	17	38	1.683 (0.866–3.274)	0.1248	<b>2.324 (1.064–5.075)</b>	<b>0.0344</b>
		A	403	81	63	70	1	–	1	–
		T	95	19	27	30	<b>1.818 (1.099–3.007)</b>	<b>0.0199</b>	<b>2.109 (1.178–3.777)</b>	<b>0.0121</b>
Gene	SNP ID	Pooled genotype	Early onset (n = 164)		Late onset (n = 117)		Univariate		Multivariate <sup>**</sup>	
			n	%	n	%	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
TLR3	rs3775291	CC	83	43	49	60	1	–	1	–
		CT	90	47	28	35	<b>0.527 (0.303–0.915)</b>	<b>0.0229</b>	0.566 (0.316–1.013)	0.0552
		TT	20	10	4	5	0.339 (0.109–1.049)	0.0605	<b>0.307 (0.095–0.994)</b>	<b>0.0488</b>
		CT+TT	110	57	32	40	<b>0.493 (0.290–0.836)</b>	<b>0.0087</b>	<b>0.514 (0.294–0.898)</b>	<b>0.0194</b>
		C	256	66	126	78	1	–	1	–
		T	130	34	36	22	<b>0.563 (0.367–0.862)</b>	<b>0.0082</b>	<b>0.564 (0.361–0.883)</b>	<b>0.0122</b>
TLR9	rs187084	TT	69	35	40	50	1	–	1	–
		TC	105	53	31	38	<b>0.509 (0.291–0.891)</b>	<b>0.0180</b>	<b>0.433 (0.237–0.794)</b>	<b>0.0067</b>
		CC	25	12	10	12	0.690 (0.301–1.583)	0.3810	0.697 (0.294–1.652)	0.4120
		TC+CC	130	65	41	51	<b>0.544 (0.322–0.919)</b>	<b>0.0229</b>	<b>0.438 (0.275–0.849)</b>	<b>0.0115</b>
		T	243	61	111	69	1	–	1	–
		C	155	39	51	31	0.749 (0.510–1.099)	0.1397	0.753 (0.491–1.101)	0.1357
TLR9	rs352140	GG	41	21	25	31	1	–	1	–
		GA	100	52	34	43	0.558 (0.297–1.048)	0.0698	<b>0.477 (0.240–0.948)</b>	<b>0.0346</b>
		AA	52	27	21	26	0.662 (0.326–1.347)	0.2553	0.502 (0.234–1.077)	0.0767
		GA+AA	152	79	55	69	0.593 (0.331–1.065)	0.0805	<b>0.423 (0.213–0.841)</b>	<b>0.0141</b>
		G	182	47	84	52	1	–	1	–
		A	204	53	76	48	0.799 (0.522–1.155)	0.2330	0.697 (0.470–1.032)	0.0713

Abbreviations: TLR = toll-like receptor; SNP = single nucleotide polymorphism; PsA = psoriatic arthritis; OR = Odds ratio; CI = Confidence interval.

<sup>†</sup> Adjusted parameters included sex, age of disease onset, disease duration, family history and PASI values.<sup>\*\*</sup> Adjusted parameters included sex, family history and psoriatic arthritis.Please cite this article in press as: M. Julià, et al., Genetically defined variants of toll-like receptors 3, 7 and 9 as phenotype and risk modifier factors for psoriasis, J Dermatol Sci (2017), <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.12.004>

disease onset. These three mutated alleles of TLR9 have been shown to up-regulate receptor transcription activity.

Bearing in mind the role of the TLR9 rs5743836 polymorphism as a genetic risk factor for psoriasis and the association between early-onset psoriasis and a more severe phenotype, our results seem to fit well in a multiple relationship where greater TLR9 transcription activity leads to earlier disease onset, a more severe phenotype and a greater risk for psoriasis.

In conclusion, our results strengthen the concept that acid nucleic-sensing TLRs play a key role in psoriasis and showed significant associations between functional TLR3, TLR7 and TLR9 SNPs and PsA, earlier disease onset and a greater risk for psoriasis.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest that may inappropriately influence the representation or interpretation of reported research results.

#### References

- [1] M.A. Lowes, M. Suarez-Farinas, J.G. Krueger, *Immunology of psoriasis*, *Annu. Rev. Immunol.* 32 (2014) 227–255.
- [2] J.Q. Chen, P. Szodoray, M. Zeher, Toll-like receptor pathways in autoimmune diseases, *Clin. Rev. Allergy Immunol* 50 (1) (2016) 1–17.
- [3] R. Lande, J. Gregorio, V. Facchinetti, et al., Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide, *Nature* 449 (7162) (2007) 564–569.
- [4] B. Massot, M.L. Michel, S. Diem, et al., TLR-induced cytokines promote effective proinflammatory natural Th17 cell responses, *J. Immunol.* 192 (12) (2014) 5635–5642.
- [5] J.M. Gelfand, A.L. Neimann, D.B. Shin, X. Wang, D.J. Margolis, A.B. Troxel, Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis, *J. Am. Med. Assoc.* 296 (14) (2006) 1735–1741.
- [6] C.E. Griffiths, E. Christophers, A. Szumski, H. Jones, L. Mallbris, Impact of early vs. late disease onset on treatment response to etanercept in patients with psoriasis, *Br. J. Dermatol.* 173 (5) (2015) 1271–1273.
- [7] R.L. Smith, H.L. Hebert, J. Massey, et al., Association of Toll-like receptor 4 (TLR4) with chronic plaque type psoriasis and psoriatic arthritis, *Arch. Dermatol. Res.* 308 (3) (2016) 201–205.
- [8] G. Shi, T. Wang, S. Li, et al., TLR2 and TLR4 polymorphisms in Southern Chinese psoriasis vulgaris patients, *J. Dermatol. Sci.* 83 (2) (2016) 145–147.
- [9] M. Zablorna, M. Sobjanek, D. Purzycka-Bohdan, A. Szczerkowska-Dobosz, B. Nedoszytko, R.J. Nowicki, The significance of toll-like receptor (TLR) 2 and 9 gene polymorphisms in psoriasis, *Postepy Dermatol. Alergologii* 34 (1) (2017) 85–86.
- [10] S.J. Kim, Z. Chen, A.B. Essani, et al., Identification of a novel toll-like receptor 7 endogenous ligand in rheumatoid arthritis synovial fluid that can provoke arthritic joint inflammation, *Arthritis Rheumatol.* 68 (5) (2016) 1099–1110.

M. Julià<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Dermatología, Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, Spain, <sup>b</sup>Servei de Dermatologia, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

M. Consuegra-Fernández

Immunoreceptores del Sistema Innat i Adaptatiu, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

A. Guilabert, C. Muñoz

Servei de Dermatologia, Hospital General de Granollers, Barcelona, Spain

A. Esteve

Registre Hospitalari de Tumors, Hospital Germans Trias i Pujol, Institut Català d'Oncologia, Badalona, Spain

N. Armiger-Borràs, F. Santiago, M.T. Arias

Immunoreceptores del Sistema Innat i Adaptatiu, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

R. Romaní

Servei de Dermatologia, Consorci Sanitari Parc Taulí, Autonomous University of Barcelona, Sabadell, Spain

C. Ferrándiz, J.M. Carrascosa

Servei de Dermatologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

E. Pedrosa

Laboratori d'Immunobiologia per Investigació i Aplicacions al Diagnòstic, Banc de Sang i Teixits (BST), Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

M. Alsina-Gibert

Servei de Dermatologia, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

F. Lozano<sup>a,b,c,1</sup>

<sup>a</sup>Immunoreceptores del Sistema Innat i Adaptatiu, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, <sup>b</sup>Departament de Biomedicina, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>c</sup>Servei d'Immunologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

J.M. Mascaró-Galy<sup>1</sup>

Servei de Dermatologia, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>1</sup>Should be considered as senior authors of this work.

\* Corresponding author at: Servicio de Dermatología, Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, Avda. Montevideo 18, 48013 Bilbao, Vizcaya, Spain.

E-mail address: [marc.juliamanresa@osakidetza.eus](mailto:marc.juliamanresa@osakidetza.eus) (M. Julià).

Received 11 August 2017



**Artículo original nº 2**

**“*Toll*-like receptor 9 promoter polymorphism as a predictive factor of narrow-band UVB phototherapy response in patients with Psoriasis”.**

Romaní J<sup>1</sup>, Julià M<sup>2</sup>, Lozano F<sup>3</sup>, Muñoz-Santos C<sup>4</sup>, Guilabert A<sup>4</sup>, Carrascosa JM<sup>5</sup>, Rigla M<sup>6</sup>, Luelmo J<sup>1</sup>.

**Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine 2015; 31: 98–103.**

1. Department of Dermatology, Consorci Sanitari Parc Taulí, Autonomous University of Barcelona, Sabadell, Spain.
2. Department of Dermatology, Hospital Universitario de Álava, Vitoria-Gasteiz, Spain.
3. Department of Immunology, Hospital Clinic i Provincial, Barcelona, Spain.
4. Department of Dermatology, Hospital General de Granollers, Barcelona, Spain.
5. Department of Dermatology, Hospital Germans Trias I Pujol, Barcelona, Spain.
6. Department of Endocrinology, Consorci Sanitari Parc Taulí, Autonomous University of Barcelona, Sabadell, Spain.

Factor de impacto año 2014: 1.259

Ranking 40/142 en su área de conocimiento, Dermatología (2º cuartil).



## ORIGINAL ARTICLE

# Toll-like receptor 9 promoter polymorphism as a predictive factor of narrow-band UVB phototherapy response in patients with psoriasis

Jorge Romani<sup>1</sup>, Marc Julià<sup>2</sup>, Francisco Lozano<sup>3</sup>, Carlos Muñoz-Santos<sup>4</sup>, Antonio Guilabert<sup>4</sup>, José M Carrascosa<sup>5</sup>, Mercedes Rigla<sup>6</sup> & Jesús Luelmo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology, Consorci Sanitari Parc Taulí, Autonomous University of Barcelona, Sabadell, Spain.

<sup>2</sup>Department of Dermatology, Hospital Universitario de Álava, Vitoria-Gasteiz, Spain.

<sup>3</sup>Department of Immunology, Hospital Clinic I Provincial, Barcelona, Spain.

<sup>4</sup>Department of Dermatology, Hospital General de Granollers, Barcelona, Spain.

<sup>5</sup>Department of Dermatology, Hospital Germans Trias I Pujol, Barcelona, Spain.

<sup>6</sup>Department of Endocrinology, Consorci Sanitari Parc Taulí, Autonomous University of Barcelona, Sabadell, Spain.

## Key words:

phototherapy; psoriasis; toll-like receptor; UVB

## Correspondence:

Dr Jorge Romani, M.D., Ph.D., Servei de Dermatologia, Hospital ParcTaulí, Sabadell 08208 Barcelona, Spain.  
Tel: +34 646206294  
Fax: 0034 935892663  
e-mail: jromani@tauli.cat

Accepted for publication:  
16 December 2014

## Conflicts of interest:

None declared.

## SUMMARY

### Background

Prediction of response to ultraviolet B (UVB) phototherapy in psoriatic patients mainly relies on clinical criteria, although some genetic predictors have been identified. Toll-like receptors (TLRs) have been involved in psoriasis pathogenesis through activation of the innate immune system. Their polymorphisms may condition not only the clinical profile of psoriasis but also the response to therapy.

### Methods

We analyzed the role of functional single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of *TLR2*, 5, 4, and 9 in clinical response to a standard narrow-band UVB (NBUVB) therapy in 39 patients with moderate to severe psoriasis.

### Results

We found a significant relationship between TLR9-1486T/C SNP variants and a better response to NBUVB phototherapy. Patients with TC and CC genotype showed a higher improvement of Psoriasis Area and Severity Index (PASI) than patients with TT genotype. Results of multivariate analysis indicate that the differences in PASI improvement at the end of phototherapy attributed to TLR9 SNP genotype were not dependent on the patients' phototype, age, gender, body mass index, basal PASI, or disease evolution.

### Conclusions

We describe a functional genetic variant in TLR9 gene that might affect the susceptibility to antipsoriatic treatment. The search of genetic predictive factors may be helpful in therapy selection and optimization of therapeutic regimes in psoriatic patients.

*Photodermatology Photoimmunology Photomedicine* 2015; 31: 98–103

Phototherapy is a standard treatment of psoriasis. Among the different modalities of treatment, narrow-band ultraviolet B phototherapy (NBUVB) with TL01 lamps, emitting an electromagnetic spectrum centered in 311 nm, is the most widespread option (1). Its mode of action involves direct cytotoxicity against Th1 lymphocytes, dendritic cells, Langerhans cells, keratinocyte apoptosis, and upregulation of Treg lymphocytes (2–4). In the clinical setting, the choice of NBUVB as a therapeutic option is based on clinical criteria (3). As a general rule, a worse response is expectable with big size, infiltrated psoriasis plaques (5), low phototype (6), and psychological stress (7). A better response is achieved in female patients and in patients with lower body mass index (8).

Genetic predictors of response to phototherapy have been relatively under-explored. Vitamin D receptor polymorphisms may predict duration of remission after NBUVB (9). Melanocortin 1 receptor polymorphisms have been associated to erythema sensitivity to Psoralen plus ultraviolet A therapy and glutathione-S-transferases may be involved in response to phototherapy (10, 11). In the present study, we aimed to characterize new response predictors through the analysis of toll-like receptor (*TLR*) gene polymorphisms.

*TLRs* are germ-line-encoded pattern-recognition receptors evolved to recognize components of foreign pathogens or cellular stressing molecules, known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs), respectively (12). They are located on the surface and intracellular compartments of many immune and non-immune cells including monocytes, dendritic, natural killer cells, keratinocytes, and fibroblasts. They are considered a key element in both the initiation of innate immune response and the priming of antigen-specific adaptive immune response. To date, 10 *TLRs* (TLR1 to TLR10) have been described in humans, with different specificity for PAMP and DAMP recognition. Their activation leads to production of inflammatory cytokines and interferons aimed at fighting against microbial infection or cell assault as a first-line response of the innate host defense. The derived specific adaptive immune response is determined by the specific *TLR* and the proper containing cell. *TLR* genes may present several polymorphisms. In fact, single-nucleotide polymorphisms (SNP) have been described in almost all *TLRs* genes. Frequently, SNPs' impact on receptor functionality has not been fully clarified but many have been associated to both infectious and autoimmune diseases, a topic recently reviewed (13).

Recently, the role of innate immune response has been implicated in psoriasis (14, 15), particularly in the initial

phase of lesion genesis, triggered by local stress (Koebner's phenomenon) or infection (16). This initial phase in 'early' lesions is mainly mediated by neutrophils, activated mast cells, and plasmacytoid dendritic cells, which are a source of interferon-alpha and interleukin-1. In a second phase, in 'late' psoriatic lesions, an adaptive immune response is responsible for maintenance of inflammation inside the plaque, driven by mononuclear cells and Th1–Th17 lymphocytes. Inside a psoriatic plaque, areas with 'early' or 'late' infiltrates can be observed. In fact, psoriasis can be viewed as an inflammatory process including the alternation of an autoinflammatory phase with an adaptive phase. Besides that, activation of the innate immunity could serve as an explanation for priming of inflammatory pathways and energy-saving mechanisms associated with obesity, adipokine production, and genesis of metabolic syndrome that psoriasis patients commonly develop (17, 18).

Thus, different functional abilities in key elements involving both the innate and the adaptive immune response, as *TLRs* do, could influence on the disease severity, the metabolic syndrome characteristics, and the response to therapy in psoriasis patients. Our primary objective was to analyze distinct *TLR* SNPs in a psoriasis patient cohort treated with NBUVB in order to detect possible differences in treatment response and baseline metabolic syndrome characteristics.

## MATERIALS AND METHODS

Patients were consecutively recruited in our phototherapy unit. They should meet the following inclusion criteria: age > 18 years, moderate to severe psoriasis vulgaris [Psoriasis Area and Severity Index (PASI) > 10], without psoriatic arthritis, and being eligible to treatment with UVB.

The study was approved by the local ethical committee and it conformed to the Helsinki Agreement. The patients gave written informed consent.

The NBUVB radiation (311 nm) was administered using a Waldmann 7002 cabin (Waldmann Medizintechnik, Villigen-Schwebbingen, Germany). The energy output was measured with a standard intrinsic UV meter. Initial dose was dependent on the phototype, and the increasing dose schedule followed the Guidelines of the Spanish Photobiology Group published by Carrascosa *et al.* (5). We recorded the following variables for each patient: age, gender, age at onset of psoriasis, treatment history, family history of psoriasis, body mass index, waist circumference, criteria for metabolic syndrome, and baseline PASI (calculated immediately before the first phototherapy session) and its improvement after treatment (recorded immediately after the last phototherapy treatment and

Romaní *et al.*

on a monthly basis thereafter). PASI improvement was calculated by subtracting final PASI to initial PASI and expressed in percentage (% PASI improvement). Number of phototherapy sessions, erythema, or other side effects associated with the treatment and cumulative dose received were also recorded.

Peripheral blood was extracted and leukocyte genomic DNA was purified using a commercially available QIAamp DNA blood minikit (Qiagen, Hilden, Germany). *TLR* polymorphisms were genotyped using a polymerase chain reaction sequencing-based method, with sequence-specific primers. The following eight SNPs at the *TLR2* (rs121917864, rs5743708), *TLR4* (rs4986790, rs4986791), *TLR5* (rs5744168), and *TLR9* (rs352140, rs5743836, rs187084) genes were analyzed. SNPs, SNP identification number, and genotypes are listed in Table 1.

### Statistical analysis

Data sets were tested for normality. Student's paired *t*-test for quantitative variables and McNemar test for qualitative variables were used in order to detect a statistical significance in the study variables depending on the different *TLR* receptor genotypes. As the variable 'length of remission' did not show normal distribution, Wilcoxon test was applied in its analysis. Because of the small size of our sample, we did not perform haplotype analysis. Multivariate linear regression analysis was conducted in order to evaluate the relationship between the improvement (response variable) and the explanatory variables registered at baseline, including the polymorphism in its dichotomic form (wild/variant). All *P* values were two-sided and a *P* value < 0.05 was considered statistically significant. Results are presented as mean ± standard deviation. Statistical calculations were performed with SPSS 22.0 software (IBM Corp., Armonk NY, USA).

### RESULTS

The study population comprised 39 patients, 23 men and 16 women, with a mean age of 46.64 ± 14.4 years. Phototype III was predominant. Mean age of psoriasis onset was 33 ± 13.4 years. Family history for psoriasis was present in 50% of the patients. Mean body mass index was 27.76 ± 5.05. Metabolic syndrome following International Diabetes Foundation criteria was present in 58.97% of the patients. Mean basal PASI was 15.41 ± 5.55. No significant side effects, including erythema associated to treatment, were recorded. There were no withdrawals from treatment. Improvement after the treatment course was statistically significant (*P* = 0.0001), resulting in a mean improvement of 79.70 ± 15%. Mean final PASI was 3.21 ± 2.75. Patients completed a mean number of 27.15 ± 4.19 treatments with a total accumulated mean dose of 24.84 ± 7.07 J/cm<sup>2</sup>. The period of relapse-free interval, defined as PASI < 10 and/or no need of subsequent systemic treatment, was 10.93 ± 11.36 months.

Regarding *TLR* gene receptor genotyping, no significant differences were detected in the study variables depending on *TLR4*, *TLR2*, and *TLR5* SNP genotype. We only found significant differences in *TLR9* SNP T-1486C. In our study population, 13 patients (33.3%) showed a TT genotype, and 26 patients (66.6%) showed a variant (TC or CC). Table 2 outlines the specific parameters recorded for every genotype.

Multivariate analysis (Table 3) showed differences in PASI improvement favoring *TLR9* SNP variants (TC or CC) that were not dependent on the patients' phototype, age, gender, body mass index, basal PASI, length of remission, or disease evolution.

Variant carriers showed a greater improvement in PASI after phototherapy (84.17 ± 11.85% vs. 70.76 ± 17.05%) (*P* = 0.007), and remissions achieved were significantly

**Table 1.** Gene, SNPs, SNP ID number, location, and genotype for each *TLR* polymorphism studied. Paternal and maternal alleles are combined arising three potential genotypes. Amino acid change due to the variant allele is showed in brackets unless the SNP is not translated

Gene	SNP	Chr	SNP ID	Location	Genotype (amino acid change)
<i>TLR2</i>	C2029T	4	rs12917864	Exon (non-synonymous)	CC; CT; TT (Arg677Trp)
	G2258A		rs5743708	Exon (non-synonymous)	AA; AG; GG (Arg753Gln)
<i>TLR4</i>	A896G	9	rs4986790	Exon (non-synonymous)	AA; AG; GG (Asp299Gly)
	C1196T		rs4986791	Exon (non-synonymous)	CC; CT; TT (T399I)
<i>TLR5</i>	C1174T	1	rs5744168	Exon (non-synonymous)	CC; CT; TT Arg392Stop)
<i>TLR9</i>	G1635A	3	rs352140	Exon (synonymous)	GG; GA; AA (P545P)
	T-1237C		rs5743836	5' near gene	TT; TC; CC (untranslated)
	C-1486T		rs187084	5' near gene	CC; CT; TT (untranslated)

Chr, chromosome; SNP, single-nucleotide polymorphism; *TLR*, toll-like receptor.

**Table 2.** Specific parameters studied for each of the TLR9 gene SNP 1486T/C genotypes: TT (wild type), combined variant genotype (TC/CC), TC, and CC

	TT (wild-type)	TC/CC (variant)	TC	CC	<i>P</i> value (wild vs. variant)
<i>n</i> (total = 39)	13	26	23	3	
Age (years)	42.23 ± 14.35	48.84 ± 18.64	46.73 ± 17.56	65 ± 22.53	0.12
Male/female	8/5	15/11	14/9	1/2	0.66
Basal PASI	16.90 ± 5.39	14.66 ± 5.58	14.93 ± 5.88	12.56 ± 1.48	0.39
Final PASI	4.52 ± 3.33	2.46 ± 1.98	2.58 ± 1.99	0.60 ± 0.60	<b>0.008</b>
%PASI improvement	70.76 ± 17.05	84.17 ± 11.85	82.71 ± 11.77	95.41 ± 4.27	<b>0.007</b>
Length of remission (months)	6.63 ± 6.40	12.76 ± 13.69	13.36 ± 13.69	11.33 ± 4.04	<b>0.04</b>

Results are expressed in mean ± standard deviation.

PASI, Psoriasis Area and Severity Index; SNP, single-nucleotide polymorphism; *TLR*, toll-like receptor. Bold numerals: statistically significant.

**Table 3.** Univariate and multivariate analysis (linear regression) including percentage in PASI improvement as a dependent variable and TLR9 gene SNP 1486T/C variant genotypes, sex, age, body mass index, phototype, basal PASI, age of psoriasis onset, and length of remission after phototherapy as independent variables

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Non-standardized coefficient ± standard error	<i>P</i> value	Non-standardized coefficient ± standard error	<i>P</i> value
TLR9 SNP 1486T/C	12.15 ± 3.63	<b>0.002</b>	11.50 ± 3.98	<b>0.005</b>
Age	0.06 ± 0.14	0.66	–	–
Sex	6.26 ± 4.84	0.20	4.78 ± 4.44	0.29
Body mass index	0.44 ± 0.48	0.36	–	–
Phototype	–5.67 ± 3.99	0.16	–0.67 ± 3.97	0.86
Age of onset	0.06 ± 0.14	0.66	–	–
Basal PASI	–0.30 ± 0.44	0.49	–	–
Length of remission	0.234 ± 0.23	0.31	–	–

Genotypic variants were independently associated with PASI improvement. Multivariate model included all candidate variables showing *P* value ≤ 0.20 in the univariate analysis.

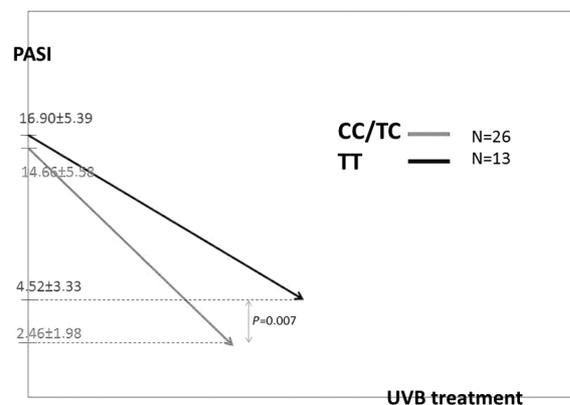
PASI, Psoriasis Area and Severity Index; SNP, single-nucleotide polymorphism; *TLR*, toll-like receptor.

longer (12.76 ± 13.69 vs. 6.63 ± 6.40 months) (*P* = 0.046). A trend was found for the variant carriers requiring less phototherapy treatments and a lower mean cumulative dose (23.64 ± 6.90 vs. 27.25 ± 6.93) (J/cm<sup>2</sup>), although differences were not statistically significant. Our relevant results are graphically depicted in Fig. 1.

## DISCUSSION

We have found a genetic variant in TLR9 receptor gene that confers susceptibility to both a better and a sustained response to NBUBV phototherapy in psoriatic patients. *TLRs* represent a key element of the innate immunity in sensing foreign pathogen and damage-associated mol-

ecules, an immunological pathway that has been preserved through evolution, and are believed to be involved in the pathogenesis of autoinflammatory syndromes. Psoriasis is a chronic relapsing skin disease mediated by elements of the innate and adaptive immune systems, and some authors propose that it should be regarded as an autoinflammatory disease (14). In fact, psoriasis could be viewed as a bimodal disease where both alternative mechanisms can explain the initiation of lesions and its maintenance (16). The role of *TLRs* in the pathogenesis of psoriasis has not been yet clarified, but some authors have reported an increase of their expression (19). García-Rodríguez *et al.* (20) reported an increase of the genic expression of *TLR4* and *TLR2* in psoriasis, a correlation

Romani *et al.*

**Fig. 1.** Graphic view of the results in the genotyping of TLR9 gene SNP 1486T/C. Patients with CC and TC genotype (grey line) achieved a higher reduction in PASI ( $P = 0.007$ ) than homozygous patients (TT) (black line). The number of phototherapy sessions required was lower, although the difference was not statistically significant. PASI, Psoriasis Area and Severity Index; UVB, ultraviolet B.

with regulatory and proinflammatory cytokines, and low-grade inflammation. Other authors have reported a dysregulated expression of *TLRs*, antimicrobial peptides, and vitamin D receptors in lesional psoriatic skin (19).

TLR9 gene is located in chromosome 3p21.3. It works as a gatekeeper against infection because it recognizes CpG sequences of microbial DNA that are rare in DNA from vertebrate cells. It has been found on the surface of many cells, including monocytes, dendritic cells, natural killer cells, and B lymphocytes. The activation of TLR9 prompts an inflammatory pathway mainly driven by interferon and interleukin-12. The blockade of TLR9 has been proposed as a potential antipsoriatic treatment (21). TLR9 gene polymorphisms T-1237C and T-1486C at the promoter region are believed to alter its functionality, and they have been associated with systemic lupus erythematosus, although the results of different studies are conflicting (22). Its functional impact on the receptor was studied by Tao *et al.* (23), showing a decrease in receptor expression in variant carriers in combination with another TLR9 SNP.

It was not our aim to compare the prevalence of variants of the SNP T-1486C in psoriatic patients and the general population, because we did not include healthy controls in our study. A search of the existing literature found the

meta-analysis published by Panda *et al.* (22), comprising some studies that have assessed such polymorphism in systemic lupus erythematosus and healthy controls. From the data drawn from this paper, we can conclude that TC or CC variants also have a high prevalence in healthy population, reaching 70%. In our cohort of psoriatic patients, 66.6% of them had a variant. These data do not support an association of psoriasis with SNP T-1486C.

Antipsoriatic action of UVB phototherapy includes a direct inhibition of Th1 lymphocytes and upregulation of T regulatory lymphocytes. Additional mechanisms of action could be involved, such as vitamin D synthesis, actions of UV light involving melatonin, melanocyte-stimulating hormone, or P substance. It is also assumed that UVB exerts a direct cytotoxicity against keratinocytes, dendritic cells, Langerhans cells (2–4), and possibly more cells that take part in innate immunity. Our results have identified that a functional polymorphism in TLR9 gene confers a higher susceptibility to UVB phototherapy. We can thus postulate that carriers of genetic variants have psoriatic lesions with an inflammatory profile that is more susceptible to being inhibited by UVB phototherapy. Interestingly, a recent study (24) has linked an intracellular *TLR* (namely TLR3) as a keratinocyte damage-sensing receptor that also plays a crucial role in the immune suppression response after NB-UVB radiation. This study elegantly demonstrates the immunological pathways by which *TLRs* could influence on NB-UVB response. Unfortunately, we could not study TLR3 polymorphisms in the work herein presented.

The fact that a functional variant in one of the key elements of innate immunity exerts some influence in therapy success should encourage researchers to going deeper into the study of the mechanisms of action of UVB phototherapy against dysregulation of the innate immune system in psoriasis, which could be mostly involved in the 'early' phase of psoriatic lesions.

Limitations of this study include the small patient sample, the rather lax definition of remission, the lack of controls, and the fact that not every *TLR* gene and polymorphism could be screened.

In the future, treatment of psoriasis will probably be also based in the genetic profile of the patients, rather than in their clinical characteristics and individual preferences (25–28). In the age of pharmacogenomics, such technology will allow dermatologists to better tailor treatment options, avoiding drug toxicities and achieving optimum results for the patients.

## REFERENCES

- Green C, Ferguson J, Lakshminpathi T, Johnson BE. 311 nm UVB phototherapy: an effective treatment for psoriasis. *Br J Dermatol* 1988; **119**: 691–696.
- De Silva B, McKenzie RC, Hunter JA, Norval M. Local effects of TL01 phototherapy in psoriasis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2008; **24**: 268–269.
- Menter A, Korman NJ, Elmetts CA *et al*. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 5. Guidelines of care for the treatment of psoriasis with phototherapy and photochemotherapy. *J Am Acad Dermatol* 2010; **62**: 114–135.
- Weatherhead SC, Farr PM, Jamieson D *et al*. Keratinocyte apoptosis in epidermal remodeling and clearance of psoriasis induced by UV radiation. *J Invest Dermatol* 2011; **131**: 1916–1926.
- Carrascosa JM, López-Estabaranz JL, Carretero G *et al*. Narrowband UVB, monochromatic excimer laser, and photodynamic therapy in psoriasis: a consensus statement of the Spanish Psoriasis Group. *Actas Dermosifiliogr* 2011; **102**: 175–186.
- Kirke SM, Lowder S, Lloyd JJ *et al*. A randomized comparison of selective broadband UVB and narrowband UVB in the treatment of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 1641–1646.
- Fortune DG, Richards NL, Kirby B *et al*. Psychological stress impairs clearance of psoriasis in patients treated with photochemotherapy. *Arch Dermatol* 2003; **139**: 752–756.
- Coimbra S, Oliveira H, Belo L *et al*. Principal determinants of the length of remission of psoriasis vulgaris after topical, NB-UVB and PUVA therapy. *Am J Clin Dermatol* 2013; **14**: 49–53.
- Ryan C, Renfro L, Collins P, Kirby B, Rogers S. Clinical and genetic prediction of response to narrowband UVB for the treatment of chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 2010; **163**: 1056–1063.
- Smith G, Weidlich S, Dawe RS, Ibbotson SH. Melanocortin 1 receptor (MC1R) genotype influences erythematous sensitivity to psoralen-ultraviolet A photochemotherapy. *Br J Dermatol* 2007; **156**: 1230–1234.
- Ibbotson SH, Dawe RS, Dinkova-Kostova AT. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) genotype but not GSTT1 or MC1R genotype influences erythematous sensitivity to narrow band (TL-01) UVB phototherapy. *Pharmacogenet Genomics* 2001; **21**: 217–224.
- Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. Innate immunity: structure and function of TLRs. *Med Sci (Paris)* 2007; **23**: 67–73.
- Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA. Genetic variation in toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol* 2012; **18**: 535–542.
- Rivas Bejarano JJ, Valdecantos WC. Psoriasis as autoinflammatory disease. *Dermatol Clin* 2013; **31**: 445–460.
- Bos JD, deRie MA, Teunissen MBM, Piskin G. Psoriasis: dysregulation of innate immunity. *Br J Dermatol* 2005; **152**: 1098–1107.
- Christophers E, Metzler G, Röcken M. Bimodal immune activation in psoriasis. *Br J Dermatol* 2014; **170**: 59–65.
- Gottlieb AB, Dann F. Comorbidities in patients with psoriasis. *Am J Med* 2009; **122**: 1150.e1–1150.e9.
- Balci A, Balci DD, Yonden Z *et al*. Increased amount of visceral fat in patients with psoriasis contributes to metabolic syndrome. *Dermatology* 2010; **220**: 32–37.
- Kyung Kim S, Park S, Lee ES. Toll-like receptors and antimicrobial peptides expressions of psoriasis: correlation with serum vitamin D level. *J Korean Med Sci* 2010; **25**: 1506–1512.
- García-Rodríguez S, Arias-Santiago S, Perandrés-López R *et al*. Increased gene expression of toll-like receptor 4 on peripheral blood mononuclear cells in patients with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; **27**: 242–250.
- Suárez-Fariñas M, Arbeit R, Jiang W, Ortenzio FS, Sullivan T, Krueger JG. Suppression of molecular inflammatory pathways by toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonists in a model of IL-23-induced skin inflammation. *PLoS ONE* 2013; **8**: e84634.
- Panda AK, Pattanaik SS, Tripathy R, Das BK. TLR-9 promoter polymorphisms T-1237C and T-1486C are not associated with systemic lupus erythematosus: a case control study and meta-analysis. *Hum Immunol* 2013; **74**: 1672–1678.
- Tao K, Fujii M, Tsukumo S *et al*. Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *Ann Rheum Dis* 2007; **66**: 905–909.
- Bernard JJ, Cowing-Zitron C, Nakatsuji T *et al*. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med* 2012; **18**: 1286–1290.
- Prieto-Pérez R, Cabaleiro T, Daudén E, Ochoa D, Román M, Abad-Santos F. Pharmacogenomics of topical and systemic treatments of psoriasis. *Pharmacogenomics* 2013; **14**: 1623–1634.
- Warren RB, Griffiths CE. The potential of pharmacogenetics in optimizing the use of methotrexate for psoriasis. *Br J Dermatol* 2005; **153**: 869–873.
- Julià M, Guilabert A, Lozano F *et al*. The role of  $\text{fc}\gamma$  receptor polymorphisms in the response to anti-tumor necrosis factor therapy in psoriasis: a pharmacogenetic study. *JAMA Dermatol* 2013; **149**: 1033–1039.
- O'Reilly DD, Rahman P. Pharmacogenetics of psoriasis. *Pharmacogenomics* 2011; **12**: 87–101.

### Artículo original nº 3

#### “Genetic and experimental evidence for the involvement of the CD6 lymphocyte receptor in Psoriasis”.

Marta Consuegra-Fernández<sup>1</sup>, Marc Julià<sup>2</sup>, Mario Martínez-Florensa<sup>1</sup>, Fernando Aranda<sup>1</sup>, Cristina Català<sup>1</sup>, Noelia Armiger-Borràs<sup>1</sup>, María-Teresa Arias<sup>3</sup>, Francisca Santiago<sup>3</sup>, Antonio Guilabert<sup>4</sup>, Anna Esteve<sup>5</sup>, Carlos Muñoz<sup>4</sup>, Carlos Ferrándiz<sup>6</sup>, José-Manuel Carrascosa<sup>6</sup>, Edurne Pedrosa<sup>7</sup>, Jorge Romaní<sup>8</sup>, Mercè Alsina<sup>9</sup>, José-Manuel Mascaró-Galy<sup>9</sup> and Francisco Lozano<sup>1,3,10</sup>

#### Cellular and Molecular Immunology 2018; 15:898-906

1. Immunoreceptores del Sistema Innat i Adaptatiu, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.
2. Servicio de Dermatología, Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, Spain.
3. Servei d'Immunologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.
4. Servei de Dermatologia, Hospital General de Granollers, Barcelona, Spain.
5. Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les ITS i Sida de Catalunya (CEEISCAT), ASPC, CIBER Epidemiologia y Salud Pública, Badalona, Spain.
6. Servei de Dermatologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain.
7. Laboratori d'Immunobiologia per Investigació i Aplicacions al Diagnòstic, Banc de Sang i Teixits (BST), Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.
8. Servei de Dermatologia, Consorci Sanitari Parc Taulí, 08208 Sabadell. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain.
9. Servei de Dermatologia, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.
10. Departament de Biomedicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

Factor de impacto año 2017: 7.551

Ranking 16/155 en su área de conocimiento, Inmunología (1º cuartil).



## RESEARCH ARTICLE

# Genetic and experimental evidence for the involvement of the CD6 lymphocyte receptor in psoriasis

Marta Consuegra-Fernández<sup>1</sup>, Marc Julià<sup>2</sup>, Mario Martínez-Florensa<sup>1</sup>, Fernando Aranda<sup>1</sup>, Cristina Català<sup>1</sup>, Noelia Armiger-Borràs<sup>1</sup>, María-Teresa Arias<sup>3</sup>, Francisca Santiago<sup>3</sup>, Antonio Guilabert<sup>4</sup>, Anna Esteve<sup>5</sup>, Carlos Muñoz<sup>4</sup>, Carlos Ferrándiz<sup>6</sup>, José- Manuel Carrascosa<sup>6</sup>, Eduarne Pedrosa<sup>7</sup>, Jorge Romani<sup>8</sup>, Mercè Alsina<sup>9</sup>, José- Manuel Mascaró-Galy<sup>9</sup> and Francisco Lozano<sup>1,3,10</sup>

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease with a strong genetic background and is triggered by environmental factors. Available evidence supports CD6, a lymphocyte surface receptor mostly expressed by T cells, as a putative target in autoimmunity. Accordingly, a humanized anti-CD6 antibody has been assayed for the treatment of certain autoimmune disorders, including psoriasis. Here, we present novel evidence in mice and humans for a direct involvement of CD6 in psoriasis pathophysiology. First, an attenuated form of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation was demonstrated in CD6-deficient mice, as deduced from lower epidermal thickness and local reduced production of pro-inflammatory cytokines, namely, interleukin-17A. Thus, isolated CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T cells from CD6-deficient mice displayed decreased *in vitro* T-helper type 17 polarization. Second, a statistically significant association between CD6 single-nucleotide polymorphisms (rs17824933, rs11230563 and rs12360861) and more severe forms of psoriasis was demonstrated in a cohort of 304 patients at three public hospitals from the metropolitan area of Barcelona. Taken together, these results provide new supportive evidence of the contribution of the CD6 lymphocyte receptor in psoriasis at both experimental and clinical levels.

*Cellular and Molecular Immunology* advance online publication, 11 December 2017; doi:10.1038/cmi.2017.119

**Keywords:** ALCAM; CD5; CD6; lymphocyte; psoriasis

## INTRODUCTION

Psoriasis (Ps) is a chronic immune-mediated systemic disease mainly characterized by cutaneous manifestations that affects more than 125 million people worldwide.<sup>1</sup> Clinically, Ps may adopt multiple phenotypes, with plaque-type Ps being the most extended form of the disease.<sup>1</sup> The pathophysiology of Ps involves abnormal keratinocyte proliferation and dermal and epidermal infiltration by innate (e.g., neutrophils) and adaptive (e.g., T cells) immune cells. Ps is considered a multifactorial disease with a strong genetic, albeit polygenic, component,

which interplays with different environmental factors (namely, trauma, infection and drugs).<sup>1</sup> The most important heritability factor is found within the *PSORS1* region mapping the human leukocyte antigen, with smaller contributions from a multitude of other genetic loci mainly identified by genome-wide association studies (GWAS).<sup>2</sup> The latter includes gene candidates mostly from immune response effectors/regulators and keratinocyte differentiation-related genes.<sup>3</sup> Despite new discoveries regarding the genetic basis of Ps, the interpretation of gene-variation associations with biologic functional effects

<sup>1</sup>Immunoreceptores del Sistema Innat i Adaptatiu, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona 08036, Spain; <sup>2</sup>Servicio de Dermatologia, Hospital Universitario de Basurto, Bilbao 48013, Spain; <sup>3</sup>Servei d'Immunologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona 08036, Spain; <sup>4</sup>Servei de Dermatologia, Hospital General de Granollers, Barcelona 08402, Spain; <sup>5</sup>Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les ITS i Sida de Catalunya (CEEISCAT), ASPC, CIBER Epidemiologia y Salud Pública, Badalona 08916, Spain; <sup>6</sup>Servei de Dermatologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona 08916, Spain; <sup>7</sup>Laboratori d'Immunobiologia per Investigació i Aplicacions al Diagnòstic, Banc de Sang i Teixits (BST), Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain; <sup>8</sup>Servei de Dermatologia, Consorci Sanitari Parc Taulí, 08208 Sabadell, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain; <sup>9</sup>Servei de Dermatologia, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona 08036, Spain and <sup>10</sup>Departament de Biomedicina, Universitat de Barcelona, Barcelona 08036, Spain

Correspondence: Dr F Lozano, Centre Esther Koplowitz, Rosselló 149-153, 08036 Barcelona, Spain.

E-mail: flozano@clinic.ub.es

Received: 7 August 2017; Revised: 27 September 2017; Accepted: 28 September 2017

remains unsolved. The CD6 lymphocyte receptor has recently been implicated in the pathogenesis of some autoimmune diseases<sup>4</sup> and is currently under clinical evaluation as a putative therapeutic target for some of these diseases,<sup>5</sup> including Ps.<sup>6</sup> CD6 is a type I glycoprotein of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) superfamily, expressed by all T cells, a subset of natural killer cells and the B1a-cell subset.<sup>7</sup> The main reported CD6 ligand is CD166/ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule), which is a broadly distributed member of the immunoglobulin cell adhesion superfamily.<sup>8</sup> However, additional interactions with well-conserved bacterial components,<sup>9,10</sup> such as galectin 1 and 3,<sup>11</sup> and CD318 (also named CDCP1 for CUB domain-containing protein 1 or TRASK for transmembrane and associated with Src kinases),<sup>12</sup> have also been reported. Even though the function of CD6 remains incompletely understood, recent *in vitro* and *in vivo* evidence suggests roles in T-cell development<sup>13</sup> and in the modulation of peripheral T- and B1a-cell-mediated immune responses.<sup>14–16</sup> CD6 has a cytoplasmic tail devoid of intrinsic catalytic activity, but contains consensus motifs for Tyr and Thr/Ser<sup>17,18</sup> phosphorylation. CD6 also interacts with intracellular signaling effectors, such as mitogen-activated protein kinases,<sup>19</sup> SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa,<sup>20</sup> T-cell-specific adaptor protein<sup>21</sup> and syntenin.<sup>22</sup> These characteristics, together with its physical association with the TCR/CD3 (T-cell receptor/cluster of differentiation 3) complex,<sup>23</sup> position CD6 well to positively or negatively modulate signaling by a key receptor.<sup>24</sup> Although CD6 was

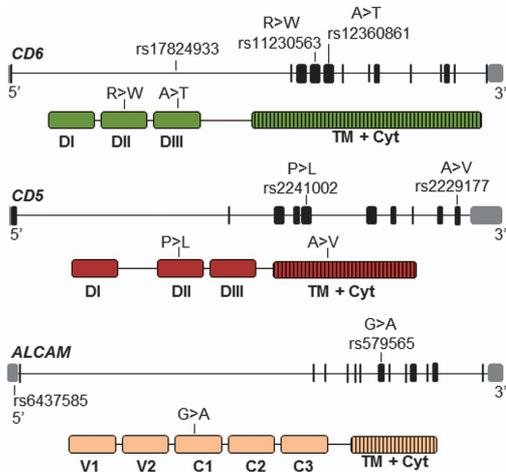
initially considered a T-cell co-stimulatory molecule based on the co-mitogenic properties of some anti-CD6 monoclonal antibodies (mAbs), later evidence from CD6 transfectants has supported a putative role for CD6 as an attenuator of TCR/CD3-mediated signaling,<sup>24</sup> a fact that has been recently confirmed by data from CD6-deficient (CD6<sup>-/-</sup>) mice.<sup>13–14</sup> Specifically, studies of such deficient mice have shown that (i) CD6 behaves as a negative modulator of TCR/CD3 signaling in the thymus, setting the threshold for the final steps of T-cell selection and maturation,<sup>13</sup> and (ii) CD6 contributes to the proper generation and function of the inducible peripheral T-regulatory (Treg) cell population.<sup>13,15</sup> Despite the current availability of a humanized anti-CD6 mAb for therapeutic purposes<sup>6</sup> and the availability of genetically modified CD6 mice,<sup>13–16</sup> *in vivo* evidence for the direct involvement of CD6 in mouse and/or human Ps has yet to be reported. To this end, we investigated the phenotype of CD6<sup>-/-</sup> mice in an experimental Ps-like model induced by imiquimod (IMQ).<sup>25</sup> Because (i) no human CD6 deficiency has been reported so far and (ii) data from experimental models of the disease should be cautiously translated into the clinic, we investigated the putative influence of previously reported CD6 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) on the clinical characteristics of a cohort of 304 psoriatic patients. The three CD6 SNPs included in the analysis have been linked to enhanced susceptibility to multiple sclerosis (MS).<sup>4</sup> Additional SNPs involving the functionally related CD5 and CD166/ALCAM genes were also investigated. CD5 encodes a lymphocyte receptor closely related to CD6. Variants of CD5 have been associated with severe forms of systemic lupus erythematosus<sup>26</sup> and a better prognosis in certain types of cancers.<sup>27,28</sup> Likewise, CD166/ALCAM variants have been associated with increased risk and progression of MS<sup>29</sup> and breast cancer.<sup>30,31</sup> The results obtained from these studies provide novel human genetic and mouse experimental evidence supporting the involvement of CD6 in the pathogenesis of Ps.

## RESULTS

### Human CD6 polymorphism impact Ps severity

Psoriatic patients ( $N=304$ ) and controls ( $N=305$ ) were genotyped for CD6 variants and investigated for association with Ps susceptibility and/or prognosis. The genetic analysis included CD6 SNPs (rs17824933, rs11230563 and rs12360861) previously associated with increased risk of MS,<sup>32,33</sup> as well as SNPs from CD5 (rs2229177 and rs2241002) and ALCAM (rs6437585 and rs579565), two functionally related genes associated with increased severity and risk of SLE and MS,<sup>26,29</sup> respectively (Figure 1).

In a first analysis, the genotypic frequencies of the CD6, CD5 and ALCAM SNPs from psoriatic patients and controls were shown to be in Hardy–Weinberg equilibrium ( $P>0.02$ ). Moreover, no statistically significant differences between patients and controls were observed for any of the SNPs, thus discarding the possibility of any being a susceptibility marker for Ps (Supplementary Table S1).



**Figure 1** Schematic location at genomic and protein levels of CD6, CD5 and ALCAM polymorphisms analyzed. Upper pictures represent the genomic organization of the genes with exons represented as black boxes, introns as solid lines and 5'- and 3'-untranslated regions as gray boxes. Lower pictures represent the extracellular and intracellular domain organization of protein products. The relative position of SNPs and non-synonymous amino-acid changes are marked. ALCAM, activated leukocyte cell adhesion molecule; Cyt, cytoplasmic domain; SNP, single-nucleotide polymorphism; TM, transmembrane domain.

In a second analysis, we evaluated whether any of the genetic variants had an effect on Ps severity. To this end, the allelic and genotypic frequencies of the *CD6*, *CD5* and *ALCAM* SNPs were compared among patients receiving or not receiving systemic treatment (categorized as moderate–severe or mild disease subgroups, respectively)<sup>34–38</sup> and among patients displaying high (>7) or low (≤7) Psoriasis Area and Severity Index (PASI) values according to previous well-established criteria.<sup>34–39</sup> Shown in Supplementary Table S2 are the median and the interquartile ranges for the clinical and demographic characteristics of patients involved in the study. Kruskal–Wallis (continuous variables) or  $\chi^2$  (frequencies) analyses showed statistically significant associations of moderate–severe Ps with earlier disease onset ( $P=0.0007$ ), arthritis occurrence ( $P=0.0023$ ), higher PASI ( $P<0.0001$ ) and longer disease duration ( $P=0.0056$ ) (Supplementary Table S2). Subsequently, multivariate genetic analyses were adjusted for age of onset, duration of the disease and presence of psoriatic arthritis. Sex was considered a confounding variable and was also adjusted. Because PASI is also considered a disease severity outcome, the same clinical variables were adjusted for PASI analyses.

Univariate analyses revealed statistically significant associations of the rs12360861A *CD6* allele with moderate–severe Ps (Table 1, top) and the rs17824933G, rs11230563C and rs12360861A *CD6* alleles with high (>7) PASI (Table 1, bottom). The latter association was maintained in subsequent multivariate analyses. By contrast, no significant relationships were observed for *CD5* and *ALCAM* SNPs regarding any indicator of Ps severity (Supplementary Table S3).

Univariate and multivariate analyses also showed statistically significant associations for individual and/or pooled genotype frequencies of *CD6* SNPs with moderate–severe Ps (Table 2, top) and/or high (>7) PASI (Table 2, bottom). Again, no

statistically significant association was found for any of the *CD5* and *ALCAM* SNPs.

Further haplotype analyses showed that the *CD6* SNPs were linked to each other with  $D'$  values >95% and  $r$  values of  $-0.47$  (rs17824933 vs rs11230563),  $-0.31$  (rs17824933 vs rs12360861) and  $0.64$  (rs11230563 vs rs12360861), thus confirming that they were in high linkage disequilibrium (LD) and constituted an LD block.

Four inferred *CD6* haplotypes accounted for 99.6% of estimated haplotypes in psoriatic patients (Table 3). Further haplotype analyses revealed that the allele combination rs17824933<sup>C</sup>, rs11230563<sup>T</sup> and rs12360861<sup>A</sup> together with the allele combination rs17824933<sup>C</sup>, rs11230563<sup>T</sup> and rs12360861<sup>G</sup> (Supplementary Table S2, bottom) was significantly linked to lower PASI ( $P=0.0086$  and  $P=0.013$ , respectively). The significance of the latter association was maintained in multivariate analyses. Additionally, the frequency of the haplotype carrying the three risk *CD6* SNPs in the control population was compared with those in patients with 'mild' and 'severe' Ps (Supplementary Table S4) and patients displaying low (≤7) and high (>7) PASI scores (Supplementary Table S5). Univariate analyses in each case revealed no statistically significant associations between any of the studied patient subgroups and the controls.

Finally, the statistical analysis was further extended to include potential *CD6* SNP genotype associations with earlier/later onset of Ps, which is often linked with irregular courses and having strong tendencies to become generalized.<sup>40–42</sup> The results showed a significant relationship between the age of Ps onset and the rs17824933 SNP ( $P=0.0075$  and  $P=0.0095$ , the latter for the pooled genotype), with the earliest onset linked to the heterozygous combination (Supplementary Figure S1).

**Table 1** *CD6* SNPs allele distribution in patients displaying 'mild' and 'moderate-severe' (top) or PASI scores ≤7 and >7 (bottom)

SNP	Allele	Mild Ps No. (%)	Moderate-severe Ps No. (%)	ORa (95% CI) <sup>b</sup>	P value	Adj.c ORa (95% CI) <sup>b</sup>	Adj.c P value
rs17824933	C	182 (80.5)	271 (72.8)	1.54 (1.03–2.30)	0.0343	1.44 (0.93–2.21)	0.1009
	G	44 (19.5)	101 (27.2)				
rs11230563	C	110 (51.9)	213 (60.5)	0.70 (0.50–0.99)	0.0453	0.68 (0.47–0.99)	0.0463
	T	102 (48.1)	139 (39.5)				
rs12360861	G	60 (28.6)	70 (20.0)	0.63 (0.42–0.93)	0.0206	0.68 (0.44–1.05)	0.0811
	A	150 (71.4)	280 (80.0)				
SNP	Allele	PASI ≤ 7 No. (%)	PASI > 7 No. (%)	ORa (95% CI) <sup>b</sup>	P-value	Adj.c ORa (95% CI) <sup>b</sup>	Adj.c P value
rs17824933	C	226 (80.7)	227 (71.4)	1.68 (1.14–2.46)	0.0082	1.59 (1.05–2.42)	0.0284
	G	54 (19.3)	91 (28.6)				
rs11230563	C	127 (49.2)	196 (64.1)	0.54 (0.39–0.76)	0.0004	0.53 (0.37–0.78)	0.0010
	T	131 (50.8)	110 (35.9)				
rs12360861	G	75 (29.3)	55 (18.1)	0.53 (0.36–0.79)	0.0019	0.56 (0.36–0.85)	0.0074
	A	181 (70.7)	249 (81.9)				

<sup>a</sup>OR = Odds Ratio

<sup>b</sup>CI = Confidence Interval

<sup>c</sup>Adj. = Adjusted; multivariate analysis adjusted by onset of disease, arthropathy occurrence, gender and disease length.

**Table 2 CD6 SNP genotypic frequency distribution among patients displaying 'mild' or 'moderate-severe' Ps (top) as well as low ( $\leq 7$ ) or high ( $> 7$ ) PASI scores (bottom)**

SNP	Genotype	Mild Ps, no. (%)	Moderate-severe Ps no. (%)	OR (95% CI)	P-value	Adj. <sup>a</sup> OR (95% CI)	Adj. <sup>a</sup> P-value
Rs17824933	CC	76 (67.3)	97 (52.2)				
	CG	30 (26.5)	76 (40.9)	1.99 (1.18–3.33)	0.009	1.78 (1.00–3.18)	0.049
	GG	7 (6.2)	13 (6.9)	1.45 (0.55–3.83)	0.447	1.25 (0.43–3.68)	0.681
	CG+GG	37 (32.7)	89 (47.8)	1.88 (1.16–3.07)	0.0103	1.68 (0.98–2.90)	0.061
Rs11230563	CC	26 (24.5)	72 (40.9)				
	CT	58 (54.7)	69 (39.2)	0.43 (0.24–0.76)	0.0036	0.42 (0.22–0.80)	0.008
	TT	22 (20.8)	35 (19.9)	0.57 (0.29–1.15)	0.119	0.60 (0.27–1.32)	0.203
	CT+TT	80 (75.5)	104 (59.1)	0.47 (0.28–0.80)	0.0056	0.47 (0.26–0.85)	0.013
Rs12360861	GG	51 (48.6)	108 (61.7)				
	AG	48 (45.7)	63 (36)	0.32 (0.09–1.17)	0.0834	0.42 (0.11–1.64)	0.213
	AA	6 (5.7)	4 (2.3)	0.62 (0.38–1.02)	0.0618	0.75 (0.43–1.30)	0.304
	AG+AA	54 (51.4)	67 (38.3)	0.59 (0.36–0.96)	0.0322	0.71 (0.41–1.22)	0.211

SNP	Genotype	PASI $\leq 7$ , no. (%)	PASI $> 7$ , no. (%)	OR (95% CI)	P-value	Adj. <sup>a</sup> OR (95% CI)	Adj. <sup>a</sup> P-value
Rs17824933	CC	93 (66.4)	80 (50.3)				
	CG	40 (28.6)	66 (41.5)	1.92 (1.17–3.14)	0.0097	1.88 (1.07–3.29)	0.0288
	GG	7 (5.0)	13 (8.2)	2.16 (0.82–5.67)	0.1185	1.85 (0.63–5.42)	0.2622
	CG+GG	47 (33.6)	79 (49.7)	1.95 (1.22–3.12)	0.0051	1.87 (1.10–3.20)	0.0219
Rs11230563	CC	30 (23.3)	68 (44.5)				
	CT	67 (51.9)	60 (39.2)	0.40 (0.23–0.69)	0.0010	0.42 (0.23–0.78)	0.0063
	TT	32 (24.8)	25 (16.3)	0.35 (0.18–0.68)	0.0020	0.34 (0.16–0.74)	0.0069
	CT+TT	99 (76.7)	85 (55.6)	0.38 (0.23–0.64)	0.0002	0.40 (0.22–0.71)	0.0020
Rs12360861	GG	60 (46.9)	99 (65.1)				
	AG	60 (46.9)	51 (33.6)	0.15 (0.03–0.74)	0.0194	0.22 (0.04–1.13)	0.0694
	AA	8 (6.2)	2 (1.3)	0.52 (0.32–0.84)	0.0082	0.56 (0.32–0.97)	0.0377
	AG+AA	68 (53.1)	53 (34.9)	0.47 (0.29–0.77)	0.00023	0.52 (0.30–0.89)	0.0017

Abbreviations: Adj., adjusted; CI, confidence interval; OR, odds ratio; PASI, Psoriasis Area and Severity Index; SNP, single-nucleotide polymorphism.

<sup>a</sup>Multivariate analysis adjusted by onset of disease, arthropathy occurrence, gender and disease length.**Table 3 CD6 total patient haplotype frequency distribution and further analysis between patients displaying 'mild' and 'severe' Ps (top), as well as low ( $\leq 7$ ) vs high PASI scores (bottom)**

Rs17824933	Rs11230563	Rs12360861	%	OR (95% CI)	P-value	Adj. <sup>a</sup> ORa (95% CI)	Adj. <sup>a</sup> P-value
C	C	G	33.0				
G	C	G	24.2	1.31 (0.82–2.08)	0.26	1.12 (0.68–1.84)	0.660
C	T	A	23.6	0.61 (0.38–0.99)	0.046	0.62 (0.36–1.05)	0.074
C	T	G	19.2	0.99 (0.61–1.60)	0.95	0.77 (0.45–1.31)	0.330
C	C	G	32.5				
G	C	G	24.6	0.04 (–0.12 to 0.21)	0.59	0.01 (–0.16 to 0.17)	0.930
C	T	A	23.9	–0.23 (–0.41 to 0.06)	0.008	–0.2 (–0.37 to 0.02)	0.033
C	T	G	19.0	0.64 (–0.36 to 1.64)	0.013	–0.27 (–0.45 to 0.09)	0.003

Abbreviations: Adj., adjusted; CI, confidence interval; OR, odds ratio; PASI, Psoriasis Area and Severity Index.

<sup>a</sup>Multivariate analysis adjusted by onset of disease, arthropathy occurrence, gender and disease length.**CD6-deficient mice develop attenuated IMQ-induced Ps**

A potential *in vivo* role of CD6 in Ps development was investigated by subjecting wild-type (CD6<sup>+/+</sup>) and CD6-deficient (CD6<sup>-/-</sup>) mice<sup>13</sup> to the Ps-like skin inflammation

model induced by the topical application of the synthetic TLR7/8 agonist IMQ.<sup>25</sup> The C57BL/6 strain was chosen for this purpose because it provides a better genetic background for modeling Ps disease mechanisms.<sup>43</sup> Skin examination at the

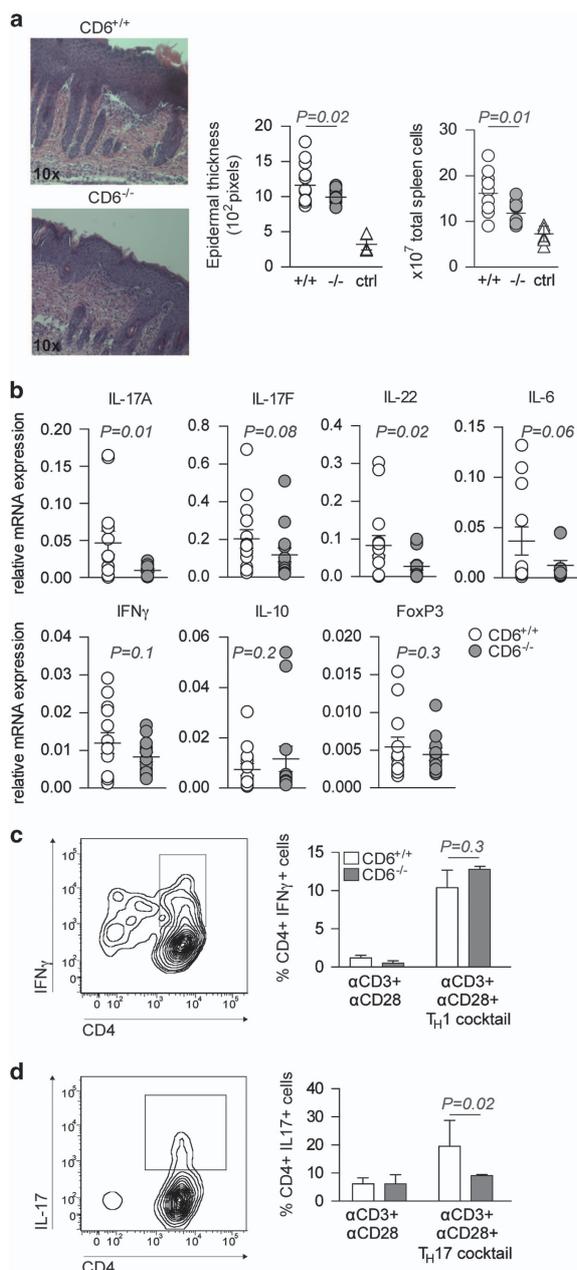
end of the experimental period (day 7) showed that CD6<sup>-/-</sup> mice had skin inflammation to a significantly lesser extent than CD6<sup>+/+</sup> controls, as demonstrated by epidermal thickness assessments (Figure 2a, left). In line with these findings, lower splenomegaly (Figure 2a, right) and decreased relative local mRNA expression of different pro-inflammatory cytokines (interleukin-17A (IL-17A), IL-17F, IL-22, IL-6 and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )) in skin lesions, which was significant for IL-17A and IL-22 (Figure 2b), were found in CD6<sup>-/-</sup> mice compared with CD6<sup>+/+</sup> controls. By contrast, no differences

were observed for the immunosuppressive effectors IL-10 and FoxP3 (Figure 2b).

In light of the attenuated local T<sub>H</sub>17 inflammatory response observed in CD6<sup>-/-</sup> mice following IMQ-induced Ps, *in vitro* T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>17 polarization assays were performed. To this end, purified CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup> T cells from CD6<sup>-/-</sup> and CD6<sup>+/+</sup> mice were cultured under T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>17 polarization conditions and further analyzed by flow cytometry for intracellular IFN- $\gamma$  and IL-17 expression. As illustrated in Figures 2c and d, non-significant differences were detected between the two groups of mice concerning the percentage of CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells. By contrast, a significantly lower percentage of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells was observed for CD6<sup>-/-</sup> T cells than for CD6<sup>+/+</sup> controls. This result was consistent with the *in vivo* data from the IMQ-induced Ps-like model and suggested that CD6 deficiency implied defective T<sub>H</sub>17 but T<sub>H</sub>1 polarization in C57BL/6 mice.

## DISCUSSION

The present work provides novel genetic and experimental insight supporting the putative involvement of the CD6 lymphocyte receptor in the pathophysiology of Ps. As far as we know, available GWAS have not provided evidence for the involvement of *CD6* polymorphisms in Ps. This was not unexpected because GWAS analyses of complex/polygenic human diseases (such as Ps) have relied on the proper density coverage of the trait loci with preselected common SNPs, most of which have no known functional implications.<sup>44</sup> This limitation can be partly overcome by gene-specific candidate-driven analyses. We focused on genetic variants of *CD5* and *CD6*, two contiguous genes on human chromosome 11q.13 coding for highly related lymphocyte surface receptors at structural and functional levels.<sup>45</sup> In fact, these genes are believed to be derived from the duplication of a common ancestral gene. The CD5 and CD6 receptors are physically associated with the antigen-specific TCR and contribute to the fine tuning of activation and differentiation signals mediated by this relevant complex.<sup>45</sup> Our analysis also included genetic



**Figure 2** CD6<sup>-/-</sup> mice show attenuated IMQ-induced Ps-like inflammation and *in vitro* T<sub>H</sub>17 polarization. (a, left) Representative hematoxylin and eosin stain (x10) of day 7 skin lesions from IMQ-treated CD6<sup>-/-</sup> and CD6<sup>+/+</sup> mice. (Right) Dot-plot showing the means of epidermal thickness and total spleen cells from IMQ- or Vaseline (ctrl)-treated mice ( $N=8$ ). A representative experiment of three performed is shown. (b) Relative cytokine mRNA expression levels in skin lesions from IMQ-treated CD6<sup>-/-</sup> and CD6<sup>+/+</sup> mice. (c, left) Representative contour plot showing the gating strategy used to detect *in vitro* polarized T<sub>H</sub>1 cells. (Right) Percentages (mean  $\pm$  s.e.m.) of CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells following stimulation of CD6<sup>-/-</sup> and CD6<sup>+/+</sup> naive T cells under T<sub>H</sub>1-polarizing and -non-polarizing conditions. (d) Same analyses as in (c) for T<sub>H</sub>17 polarization. Statistical analyses were performed by nonparametric *t*-tests for unpaired data (level of significance set at  $P<0.05$ ). ctrl, Control; IFN, interferon; IMQ, imiquimod; Ps, psoriasis; T<sub>H</sub>17, T-helper type 17.

variants of *CD166/ALCAM*, thus providing a more comprehensive analysis on the contribution of functionally related genes to Ps.

The genetic analyses showed that all three *CD6* SNPs were positively associated with Ps severity, as inferred from the need for systemic therapy and higher PASI (>7) scores. This conclusion was derived not only from the genotypic and allelic analyses but also from haplotype analyses, which showed significant associations with the two severity outcomes. Taking into account the link between the age of onset and the disease severity, also confirmed in our patient cohort, it was not unexpected that one of the *CD6* SNPs (rs17824933) was found to be associated with an earlier form of disease. Altogether, the results argued in favor of a contribution of the CD6 receptor in Ps pathophysiology and the potential usefulness of CD6 genotyping in Ps prognosis. The fact that *CD5* and *CD166/ALCAM* SNPs were found to have neutral effects also supported a specific effect of *CD6* as a disease-modifier gene in Ps. However, the putative influence of genetic variations in CD318/CDCP1/TRASK, a very recently reported CD6 ligand expressed on many epithelial cells, and some hematopoietic and mesenchymal stem cells should be further explored.<sup>12</sup>

Only a few reports have linked *CD6* gene variation to certain autoimmune conditions in different human populations. Thus, a 19-base pair insertion within the *CD6* gene was associated with good response to tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitors in a cohort of Danish rheumatoid arthritis patients.<sup>46</sup> Recently, the *CD6* rs11230563 has been associated with susceptibility to Behçet's disease in a Chinese Han population.<sup>47</sup> However, the most important and well-studied association of *CD6* polymorphism has been with MS in which T<sub>H</sub>17 cells play an important pathogenic role. The first report on this regard found that the intronic rs177824933<sup>G</sup> allele was associated with an increased risk of developing MS.<sup>4</sup> Other risk alleles within the *CD6* gene (rs11230563 and rs12360861) were soon found and validated as independent risk factors for MS.<sup>4</sup> Thus, the short list of autoimmune disorders linked to *CD6* polymorphism were subsequently extended to Ps, wherein T<sub>H</sub>17 cells have been found to play a relevant pathogenic role.<sup>48–50</sup> Interestingly, the Danish Nationwide Cohort Study linked these two inflammatory diseases and revealed Ps as a severity-dependent risk factor for MS.<sup>51</sup>

Further evidence involving CD6 in Ps physiopathology comes from the observation that CD6<sup>-/-</sup> mice exhibit attenuated IMQ-induced Ps-like skin inflammation, likely resulting from defective peripheral T<sub>H</sub>17 polarization, which has been reported in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).<sup>14</sup> These data support CD6, a component of the TCR-complex signaling machinery, as a modifier of the homeostasis of T<sub>H</sub>17 cells, a critical pathogenic subset in Ps (and EAE) physiopathology. The molecular basis linking CD6 deficiency and altered T<sub>H</sub>17 differentiation remain unknown; however, similar alterations have been reported for the T<sub>H</sub>1<sup>4,52</sup> and Treg<sup>15</sup> cell subsets. Intriguingly, CD6 is involved in T-cell development. There is evidence that natural T<sub>H</sub>17 cells (nT<sub>H</sub>17) may arise from the thymus, analogous to natural

Treg cells (nTreg).<sup>53</sup> Concomitant to the already detected defects in inducible T<sub>H</sub>17 and Treg polarization of naïve peripheral T cells,<sup>14,15</sup> defects in nT<sub>H</sub>17 development should also be explored in CD6-deficient mice, a fact that could be ignored for nTreg cells.<sup>13</sup>

Although no mouse model can accurately reproduce all aspects of human Ps,<sup>54</sup> the data from the IMQ model in CD6<sup>-/-</sup> mice correlate with our human genetic studies and highlight emerging evidence on the potential role played by CD6 in the regulation of T-cell-driven autoimmune responses.<sup>13–16</sup>

None of the *CD6* SNPs studied have been reported to induce deficient overall CD6 surface expression. The rs17824933<sup>G</sup> allele decreases the expression of full-length CD6 and increases that of the CD6 $\Delta$ D3 isoform,<sup>55</sup> which lacks the CD166/ALCAM-binding domain and is unable to co-localize with the TCR at the center of the immunological synapse.<sup>56</sup> In contrast, the rs11230563<sup>C</sup> allele is associated with higher CD6 expression.<sup>33</sup> It would be interesting to analyze whether any of the *CD6* SNPs may affect their interactions with the recently reported CD6 ligand, CD318/CDCP1/TRASK, which could impair overall CD6 functionality.<sup>12</sup>

In conclusion, the results presented in our genetic association studies of Ps patients and CD6<sup>-/-</sup> mice in an experimental model of Ps support a potential role for CD6 in Ps pathogenesis. Future studies are warranted to validate the role of CD6 in Ps physiopathology and further assess whether *CD6* genotyping would help predict patient response to distinct therapies, including anti-CD6 mAb treatment currently in clinical development.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

Psoriatic patients of European descent ( $N=304$ ) attending three Dermatology Departments from three University Hospitals (Barcelona) were included in the study. Inclusion criteria were age above 18 years and a minimum follow-up of 6 months. All patients were managed according to the clinical guidelines of the Spanish Psoriasis Group from the Spanish Academy of Dermatology and Venereology.<sup>57</sup>

Additionally, 305 unrelated volunteers from the Blood and Tissue Bank of Barcelona were included as controls ( $42 \pm 13.6$  years, 18–68 age range; 47% female). The study was approved by the three local Hospital Ethics Committees, and written informed consent was obtained from all participants before inclusion and blood extraction.

### Clinical assessment

Epidemiologic, demographic and clinical data, including age, gender, age of disease onset (early onset <40 or late onset  $\geq 40$ ), disease duration, family history of Ps, presence of psoriatic arthritis, progressive (persistent disease flare of at least 6 months) or intermittent clinical course, highest Ps area and severity index (PASI,  $\leq 7$  or  $>7$ )<sup>39</sup> and therapies received, were retrospectively collected from medical records. Patients who received at least one systemic treatment (methotrexate,

cyclosporine or acitretin), biological agent (etanercept, adalimumab, infliximab, efalizumab and/or ustekinumab) or phototherapy (oral psoralen with UVA—PUVA— or narrow-band UVB—nbUVB—) were included in the moderate–severe Ps group, whereas the rest of the patients were classified as mild.<sup>34–38</sup>

### Genotyping

Genomic DNA was purified from EDTA-anticoagulated peripheral blood using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Venio, The Netherlands) and subjected to real-time (RT)-PCR using TaqMan probes following the manufacturer's recommendations (ThermoFisher, Barcelona, Spain): *CD6* rs17824933 (assay number: C\_33967506\_10), *CD6* rs11230563 (assay number: C\_31727142\_10), *CD6* rs12360861 (assay number: C\_25922320\_10), *CD5* rs2229177 (assay number: C\_3237272\_10), *CD5* rs2241002 (assay number: C\_25472293\_20) and *ALCAM* rs6437585 (assay number: C\_29281365\_20), all from ThermoFisher (Barcelona, Spain). Primers for PCR amplification and further sequence-base typing (PCR-SBT) *ALCAM* rs579565 (Hs00666884\_CE and Hs00666884\_CE) were from ThermoFisher.

### IMQ-induced Ps mouse model

Eight- to 12-week-old *CD6<sup>-/-</sup>* and *CD6<sup>+/+</sup>* C57BL/6 females<sup>13</sup> received a daily topical dose of 62.5 mg of commercially available IMQ cream (5%, Aldara; 3M Pharmaceuticals, MEDA, Barcelona, Spain) on shaved backs for 6 consecutive days.<sup>25</sup> Control mice were likewise treated with a control vehicle (Vaseline; Braun, Barcelona, Spain). At day 7, mice were killed, and skins were harvested for further analyses. This protocol was reviewed and approved by the University of Barcelona Animal Experimentation Ethical Committee (Barcelona, Spain).

### Quantitative RT-PCR

Total mRNA was extracted from whole back skin biopsies using the PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, Barcelona, Spain). Synthesis of cDNA was performed by reverse transcription from 1 µg of total RNA (High Capacity cDNA Kit; Life Technologies). Cytokine mRNA levels were assessed by quantitative RT-PCR analysis (Taqman Fast Universal PCR Master Mix; Life Technologies) using a 7900HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Bleiswijk, The Netherlands) and the following Taqman probes (Life Technologies): *IL-17A* (Mm00439618\_m1), *IL-17F* (Mm00521423\_m1), *IL-22* (Mm01226722\_g1), *IFN-γ* (Mm01168134\_m1), *IL-10* (Mm01288386\_m1), *FoxP3* (Mm00475162\_m1), *IL-6* (Mm01210733\_m1), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (Mm99999915\_g1). Cytokine mRNA expression was adjusted by *GAPDH* expression as  $2^{-\Delta Ct}$ , where  $\Delta Ct = Ct(\text{GAPDH}) - Ct(\text{gene of interest})$ .

### T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>17 *in vitro* polarization

Electronically sorted T<sub>conv</sub> cells (*CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>*, 10<sup>5</sup> cells per well) from *CD6<sup>-/-</sup>* and *CD6<sup>+/+</sup>* spleens were cultured for 3 days in 'U'-bottomed plate-bound anti-CD3 mAb (145-2C11; 2 µg/ml; Tonbo Bioscience, San Diego, CA, USA) with soluble anti-CD28 mAb (37.51; 5 µg/ml; Tonbo Bioscience) in the presence of TGF-β (5 ng/ml; ImmunoTools, Friesoythe, Germany) and IL-6 (30 ng/ml; ImmunoTools), IL-1β (10 ng/ml; ImmunoTools), IL-23 (10 ng/ml; ImmunoTools), anti-IL-4 mAb (5 µg/ml; BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-IFNγ mAb (5 µg/ml; Tonbo Bioscience) and anti-IL-2 mAb (5 µg/ml; eBioscience, Barcelona, Spain) for T<sub>H</sub>17 induction. IL-12 (10 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and anti-IL-4 mAb (10 ng/ml; ImmunoTools) were used for T<sub>H</sub>1 induction. T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>17 cell detection was performed by intracellular cytokine staining according to the manufacturer's indications (Fixation/Permeabilization Kit with BD GolgiStop, BD Bioscience, Madrid, Spain) and further analysis by flow cytometry on a FACS Canto II equipped with CellQuest (BD Bioscience) and FlowJo 8.7 Software (Ashland, OR, USA).

### Statistical analyses

Genotypic and haplotype statistical associations among the SNPs and the disease outcomes ('mild' vs 'moderate–severe' Ps and PASI) were tested by  $\chi^2$ -test (frequencies). Univariate and multivariate logistic regression models were estimated to report unadjusted and adjusted odds ratio and their 95% confidence intervals, respectively, using 'epiR' and 'SNPassoc' packages of R software, version 3.3.3 (Available at <http://www.r-project.org/>). Disease onset (dichotomized as  $\leq 40$  and  $> 40$  years), arthropathy occurrence, gender and disease duration were included in the multivariate logistic regression models. The distribution of alleles in controls and patients was tested to fit to the Hardy–Weinberg equilibrium using the bioinformatics tool SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>).<sup>58</sup> The same tool was used in haplotype association and LD parameters *R* and *D'* analyses. Because the analysis was performed for three genes, Bonferroni's correction was applied to the asymptotic *P*-values, with  $P \leq 0.02$  considered significant.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Francesc Calafell and Elena Bosch (Institute of Evolutionary Biology, University Pompeu Fabra, Barcelona) for statistical analysis support and critically reviews of the manuscript. The work is supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (Plan Nacional I+D+i, SAF2013-46151-R and SAF2016-80535-R to FL), co-financed by the European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF. FA is supported by the Sara Borrell fellowship CD15/00016 from Instituto de Salud Carlos III.

- 1 Greb JE, Goldminz AM, Elder JT, Lebowitz MG, Gladman DD, Wu JJ *et al*. Psoriasis. *Nat Rev Dis Prim* 2016; **2**: 16082.
- 2 Hwang ST, Nijsten T, Elder JT. Recent highlights in psoriasis research. *J Invest Dermatol* 2017; **137**: 550–556.
- 3 Ray-Jones H, Eyre S, Barton A, Warren RB. One SNP at a time: moving beyond GWAS in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2016; **136**: 567–573.
- 4 Kofler DM, Farkas A, von Bergwelt-Baildon M, Hafler DA. The link between CD6 and autoimmunity: genetic and cellular associations. *Curr Drug Targets* 2016; **17**: 651–665.
- 5 Hernández P, Moreno E, Aira LE, Rodríguez PC. Therapeutic targeting of CD6 in autoimmune diseases: a review of Cuban clinical studies with the antibodies IOR-T1 and itolizumab. *Curr Drug Targets* 2016; **17**: 666–677.
- 6 Krupashankar DS, Dogra S, Kura M, Saraswat A, Budamakuntla L, Sumathy TK *et al*. Efficacy and safety of itolizumab, a novel anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase-III study. *J Am Acad Dermatol* 2014; **71**: 484–492.
- 7 Sarukhan A, Martínez-Florensa M, Escoda-Ferran C, Carrasco E, Carreras E, Lozano F. Pattern recognition by CD6: a scavenger-like lymphocyte receptor. *Curr Drug Targets* 2015; **17**: 640–650.
- 8 Brown MH. CD6 as a cell surface receptor and as a target for regulating immune responses. *Curr Drug Targets* 2016; **17**: 619–629.
- 9 Sarrias M-R, Farnós M, Mota R, Sánchez-Barbero F, Ibáñez A, Gimferrer I *et al*. CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 11724–11729.
- 10 Martínez-Florensa M, Consuegra-Fernández M, Martínez VG, Cañadas O, Armiger-Borràs N, Bonet-Roselló L *et al*. Targeting of key pathogenic factors from gram-positive bacteria by the soluble ectodomain of the scavenger-like lymphocyte receptor CD6. *J Infect Dis* 2014; **209**: 1077–1086.
- 11 Escoda-Ferran C, Carrasco E, Caballero-Bañós M, Miró-Julà C, Martínez-Florensa M, Consuegra-Fernández M *et al*. Modulation of CD6 function through interaction with Galectin-1 and -3. *FEBS Lett* 2014; **588**: 2805–2813.
- 12 Enyindah-Asonye G, Li Y, Ruth JH, Spassov DS, Hebron KE, Zijlstra A *et al*. CD318 is a ligand for CD6. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**: E6912–E6921.
- 13 Orta-Mascaró M, Consuegra-Fernández M, Carreras E, Roncagalli R, Carreras-Sureda A, Alvarez P *et al*. CD6 modulates thymocyte selection and peripheral T cell homeostasis. *J Exp Med* 2016; **213**: 1387–1397.
- 14 Li Y, Singer NG, Whitbred J, Bowen MA, Fox DA, Lin F. CD6 as a potential target for treating multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**: 2687–2692.
- 15 Consuegra-Fernández M, Martínez-Florensa M, Aranda F, de Salort J, Armiger-Borràs N, Lozano T *et al*. Relevance of CD6-mediated interactions in the regulation of peripheral T-cell responses and tolerance. *Front Immunol* 2017; **8**: 594.
- 16 Enyindah-Asonye G, Li Y, Xin W, Singer NG, Gupta N, Fung J *et al*. CD6 receptor regulates intestinal ischemia/reperfusion-induced injury by modulating natural IgM-producing B1a cell self-renewal. *J Biol Chem* 2017; **292**: 661–671.
- 17 Kobarg J, Whitney GS, Palmer D, Aruffo A, Bowen MA. Analysis of the tyrosine phosphorylation and calcium fluxing of human CD6 isoforms with different cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 2971–2980.
- 18 Bonet L, Farnós M, Martínez-Florensa M, Martínez VG, Lozano F. Identification of functionally relevant phosphorylatable serine clusters in the cytoplasmic region of the human CD6 lymphocyte surface receptor. *FEBS Lett* 2013; **587**: 2205–2213.
- 19 Ibáñez A, Sarrias M-R, Farnós M, Gimferrer I, Serra-Pagès C, Vives J *et al*. Mitogen-activated protein kinase pathway activation by the CD6 lymphocyte surface receptor. *J Immunol* 2006; **177**: 1152–1159.
- 20 Breuning J, Brown MH. T cell costimulation by CD6 is dependent on bivalent binding of a GADS/SLP-76 complex. *Mol Cell Biol* 2017; **37**; doi: 10.1128/MCB.00071-17.
- 21 Hem CD, Ekornhol M, Granum S, Sundvold-Gjerstad V, Spurkland A. CD6 and linker of activated T cells are potential interaction partners for T cell-specific adaptor protein. *Scand J Immunol* 2017; **85**: 104–112.
- 22 Gimferrer I, Ibáñez A, Farnós M, Sarrias M-R, Fenutria R, Roselló S *et al*. The lymphocyte receptor CD6 interacts with syntenin-1, a scaffolding protein containing PDZ domains. *J Immunol* 2005; **175**: 1406–1414.
- 23 Gimferrer I, Calvo M, Mittelbrunn M, Farnós M, Sarrias MR, Enrich C *et al*. Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 2004; **173**: 2262–2270.
- 24 Santos RF, Oliveira L, Carmo AM. Tuning T cell activation: the function of CD6 at the immunological synapse and in T cell responses. *Curr Drug Targets* 2016; **17**: 630–639.
- 25 van der Fits L, Mourits S, Voerman JSA, Kant M, Boon L, Laman JD *et al*. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 2009; **182**: 5836–5845.
- 26 Cenit MC, Martínez-Florensa M, Consuegra M, Bonet L, Carnero-Montoro E, Armiger N *et al*. Analysis of ancestral and functionally relevant CD5 variants in systemic lupus erythematosus patients. *PLoS One* 2014; **9**: e113090.
- 27 Potrony M, Carreras E, Aranda F, Zimmer L, Puig-Butille J-A, Tell-Martí G *et al*. Inherited functional variants of the lymphocyte receptor CD5 influence melanoma survival. *Int J Cancer* 2016; **139**: 1297–1302.
- 28 Delgado J, Bielig T, Bonet L, Carnero-Montoro E, Puente XS, Colomer D *et al*. Impact of the functional CD5 polymorphism A471V on the response of chronic lymphocytic leukaemia to conventional chemotherapy regimens. *Br J Haematol* 2016; **177**: 147–150.
- 29 Wagner M, Bilinska M, Pokryszko-Dragan A, Sobczynski M, Cyrul M, Kusnierczyk P *et al*. ALCAM and CD6—multiple sclerosis risk factors. *J Neuroimmunol* 2014; **276**: 98–103.
- 30 Zhou P, Du L-F, Lv G-Q, Yu X-M, Gu Y-L, Li J-P *et al*. Functional polymorphisms in CD166/ALCAM gene associated with increased risk for breast cancer in a Chinese population. *Breast Cancer Res Treat* 2011; **128**: 527–534.
- 31 Varadi V, Bevier M, Grzybowska E, Johansson R, Enquist-Olsson K, Henriksson R *et al*. Genetic variation in ALCAM and other chromosomal instability genes in breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat* 2012; **131**: 311–319.
- 32 De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PIW, Ottoboni L, Aggarwal NT *et al*. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet* 2009; **41**: 776–782.
- 33 Swaminathan B, Cuapio A, Alloza I, Matesanz F, Alcina A, García-Barcina M *et al*. Fine mapping and functional analysis of the multiple sclerosis risk gene CD6. *PLoS One* 2013; **8**: e62376.
- 34 Ahlehoff O, Skov L, Gislason G, Lindhardtsen J, Kristensen SL, Iversen L *et al*. Cardiovascular disease event rates in patients with severe psoriasis treated with systemic anti-inflammatory drugs: a Danish real-world cohort study. *J Intern Med* 2013; **273**: 197–204.
- 35 Gelfand JM, Shin DB, Neimann AL, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. The risk of lymphoma in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 2006; **126**: 2194–2201.
- 36 Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *JAMA* 2006; **296**: 1735.
- 37 Gelfand JM, Troxel AB, Lewis JD, Kurd SK, Shin DB, Wang X *et al*. The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Arch Dermatol* 2007; **143**: 1493–1499.
- 38 Kurd SK, Troxel AB, Crits-Christoph P, Gelfand JM, Catalin MP, Hywel W *et al*. The risk of depression, anxiety, and suicidality in patients with psoriasis: a population-based cohort study. *Arch Dermatol* 2010; **146**: 891–895.
- 39 Schmitt J, Wozel G. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology* 2005; **210**: 194–199.
- 40 Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985; **13**: 450–456.
- 41 Ferrándiz C, Pujol RM, García-Patos V, Bordas X, Smandia JA. Psoriasis of early and late onset: a clinical and epidemiologic study from Spain. *J Am Acad Dermatol* 2002; **46**: 867–873.
- 42 Langley RGB, Krueger GG, Griffiths CEM. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 2005; **64**(Suppl 2): ii18–ii23; discussion ii24–ii25.

- 43 Swindell WR, Michaels KA, Sutter AJ, Diaconu D, Fritz Y, Xing X *et al*. Imiquimod has strain-dependent effects in mice and does not uniquely model human psoriasis. *Genome Med* 2017; **9**: 24.
- 44 Wu L, Schaid DJ, Sicotte H, Wieben ED, Li H, Petersen GM. Case-only exome sequencing and complex disease susceptibility gene discovery: study design considerations. *J Med Genet* 2015; **52**: 10–16.
- 45 Sarrias MR, Gronlund J, Padilla O, Madsen J, Holmskov U, Lozano F. The scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* 2004; **24**: 1–38.
- 46 Krintel SB, Essioux L, Wool A, Johansen JS, Schreiber E, Zekharya T *et al*. CD6 and syntaxin binding protein 6 variants and response to tumor necrosis factor alpha inhibitors in Danish patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2012; **7**: e38539.
- 47 Zheng M, Zhang L, Yu H, Hu J, Cao Q, Huang G *et al*. Genetic polymorphisms of cell adhesion molecules in Behcet's disease in a Chinese Han population. *Sci Rep* 2016; **6**: 24974.
- 48 Hamzaoui K. Th17 cells in Behçet's disease: a new immunoregulatory axis. *Clin Exp Rheumatol* 2011; **29**: S71–S76.
- 49 Dos Passos GR, Sato DK, Becker J, Fujihara K. Th17 cells pathways in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders: pathophysiological and therapeutic implications. *Mediat Inflamm* 2016; **2016**: 5314541.
- 50 Marinoni B, Ceribelli A, Massarotti MS, Selmi C. The Th17 axis in psoriatic disease: pathogenetic and therapeutic implications. *Auto Immun Highlights* 2014; **5**: 9–19.
- 51 Egeberg A, Mallbris L, Gislasen GH, Skov L, Hansen PR. Risk of multiple sclerosis in patients with psoriasis: a Danish Nationwide Cohort Study. *J Invest Dermatol* 2016; **136**: 93–98.
- 52 Bughani U, Saha A, Kuriakose A, Nair R, Sadashivarao RB, Venkataraman R *et al*. T cell activation and differentiation is modulated by a CD6 domain 1 antibody Itolizumab. *PLoS One* 2017; **12**: e0180088.
- 53 Zúñiga LA, Jain R, Haines C, Cua DJ. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol Rev* 2013; **252**: 78–88.
- 54 Hawkes JE, Gudjonsson JE, Ward NL. The snowballing literature on imiquimod-induced skin inflammation in mice: a critical appraisal. *J Invest Dermatol* 2017; **137**: 546–549.
- 55 Kofler DM, Severson CA, Mousissian N, De Jager PL, Hafler DA. The CD6 multiple sclerosis susceptibility allele is associated with alterations in CD4+ T cell proliferation. *J Immunol* 2011; **187**: 3286–3291.
- 56 Castro MAA, Oliveira MI, Nunes RJ, Fabre S, Barbosa R, Peixoto A *et al*. Extracellular isoforms of CD6 generated by alternative splicing regulate targeting of CD6 to the immunological synapse. *J Immunol* 2007; **178**: 4351–4361.
- 57 Puig L, Bordas X, Carrascosa JM, Daudén E, Ferrándiz C, Hernanz JM *et al*. Consensus document on the evaluation and treatment of moderate-to-severe psoriasis. Spanish Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology. *Actas Dermosifiliogr* 2009; **100**: 277–286.
- 58 Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; **22**: 1928–1929.

Supplementary Information for this article can be found on the *Cellular & Molecular Immunology* website (<http://www.nature.com/cmi>)



## Artículo original nº 4

### “The role of Fcγ receptor polymorphisms in the response to anti-tumor necrosis factor therapy in Psoriasis: A pharmacogenetic study”.

Marc Julià MD,<sup>1,8</sup> Antonio Guilabert MD,<sup>1,8</sup> Francisco Lozano MD,<sup>2,3</sup> Belén Suarez-Casasús,<sup>2</sup> Nemesio Moreno MD,<sup>4</sup> Jose Manuel Carrascosa MD,<sup>5</sup> Carlos Ferrándiz MD,<sup>5</sup> Edurne Pedrosa PhD,<sup>6,7</sup> Mercè Alsina MD,<sup>1</sup> and José Manuel Mascaró Jr. MD.<sup>1</sup>

### JAMA Dermatology 2013; 149:1033-9

1. Dermatology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.
2. Immunology Department, Hospital Clínic, Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.
3. Cell Biology, Immunology and Neuroscience Department, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Spain.
4. Institut Català de la Salut, SAP Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain.
5. Dermatology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain.
6. Laboratory of Immunobiology for Research and Application to Diagnosis, Tissue and Blood Bank (BST), Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain.
7. Cell Biology, Physiology and Immunology. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain.
8. These authors contributed equally to this work.

Factor de impacto año 2013: 4.306

Ranking 12/139 en su área de conocimiento, Dermatología (1º cuartil).



JOBNAME: D  
 /jamanetwork/2013/der/07\_31\_2013/doi130023pap

### Original Investigation

# The Role of Fcγ Receptor Polymorphisms in the Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Psoriasis A Pharmacogenetic Study

Marc Julià, MD; Antonio Guilabert, MD; Francisco Lozano, MD; Belén Suarez-Casasús; Nemesio Moreno, MD; Jose Manuel Carrascosa, MD; Carlos Ferrándiz, MD; Edurne Pedrosa, PhD; Mercè Alsina-Gibert, MD; José Manuel Mascaró Jr, MD

**IMPORTANCE** Variability in genes encoding proteins involved in the immunological pathways of biological therapy may account for the differences observed in outcomes of anti-tumor necrosis factor (TNF) treatment of psoriasis.

**OBJECTIVE** To assess the role of 2 Fcγ receptor (FcγR) polymorphisms in the response to anti-TNF therapy in psoriasis.

**DESIGN** Retrospective series of patients with psoriasis who received anti-TNF therapy (infliximab, adalimumab, or etanercept) from January 1, 2007, through December 31, 2010. Patients were followed up for 12 weeks.

**SETTING** Two psoriasis referral centers.

**PARTICIPANTS** Seventy treatment-naive patients with moderate to severe psoriasis who received anti-TNF agents.

**INTERVENTION** Patients underwent FcγRIIA-H131R and FcγRIIIA-V158F polymorphism genotyping.

**MAIN OUTCOMES AND MEASURES** The Psoriasis Area and Severity Index and the body surface area were assessed at baseline and at treatment weeks 6 to 8 and 12. The polymorphism genotypes were correlated with the treatment outcomes.

**RESULTS** Bivariate analysis showed a nonsignificant association between FcγR low-affinity genotypes and greater improvement in the Psoriasis Area and Severity Index and body surface area at the end of treatment. Conversely, patients harboring high-affinity alleles presented a greater reduction in body surface area at the intermediate point, which remained independent in the multivariate analysis. We also detected an additive effect of both polymorphisms in the multivariate analysis. High-affinity alleles may contribute to a quicker response owing to a more efficient removal of relevant cells expressing TNF.

**CONCLUSIONS AND RELEVANCE** Preliminary results of this pilot study on the pharmacogenetics of FcγR and biological therapy in psoriasis suggest a role with clinical implications for FcγRIIA-H131R and FcγRIIIA-V158F polymorphisms in the outcome of anti-TNF treatment of psoriasis. These results might help dermatologists in guiding therapeutic decisions, especially in very severe cases where a quick response is needed.

*JAMA Dermatol.* doi:10.1001/jamadermatol.2013.4632  
 Published online July 31, 2013.

**Author Affiliations:** Author affiliations are listed at the end of this article.

**Corresponding Author:** Marc Julià, MD, Department of Dermatology, Hospital Clinic, C/ Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain (marc1978@hotmail.com).

E1

**P**soriasis is a chronic, debilitating inflammatory disease caused by genetic and environmental factors. Although psoriatic manifestations vary widely, most patients show well-circumscribed red plaques with silvery white dry scale mainly in the extensor areas and the scalp. Histopathological findings in psoriasis are characterized by aberrant epidermal proliferation and the presence of neutrophils and lymphocytes in the skin. In psoriasis, individuals with a susceptible genetic background present an immune system imbalance leading to keratinocyte activation with eventual hyperproliferation of the epidermis. The innate and adaptive immune systems are impaired, with cutaneous overexpression of helper T cell 1 cytokines (interleukin 2 [IL-2], IL-6, IL-8, IL-12, interferon  $\gamma$  [IFN- $\gamma$ ], and tumor necrosis factor [TNF]) and helper T cell 17 cytokines (IL-17, IL-21, and IL-22). This cytokine network is believed to be responsible for the initiation, maintenance, and recurrence of skin lesions.<sup>1</sup>

The emergence of biological therapies has significantly improved the prognosis of patients with psoriasis and other inflammatory disorders (eg, rheumatoid arthritis [RA]<sup>2</sup> and Crohn disease<sup>3</sup>) and neoplasms (eg, non-Hodgkin B-cell lymphoma<sup>4</sup>) by targeting proinflammatory cytokines and cell surface receptors. Biological agents are believed to exert their pharmacological effects through their variable portion (designed to block the target molecule) and their constant portion (the Fc fragment of IgG, mostly IgG1), which specifically binds the human Fc $\gamma$  receptors (Fc $\gamma$ R).<sup>5</sup> The Fc $\gamma$ Rs are expressed on the surface of nearly all immune cells. On binding to the IgG Fc fragment, Fc $\gamma$ Rs can trigger different cell functions, such as cytokine release, induction of apoptosis, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), and macrophage-mediated clearance of immunocomplexes.<sup>6</sup> These actions can also be elicited by therapeutic antibodies and are partially responsible for the efficacy of these treatments.<sup>7</sup>

Six types of human Fc $\gamma$ R have been described (Fc $\gamma$ RIA, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIAA, and Fc $\gamma$ RIIIB) encompassing genes located in chromosome 1. Some of these genes present functional allelic single-nucleotide polymorphisms (SNPs) generating interindividual differences in the affinity for the Fc portion and, therefore, in the intensity of Fc $\gamma$ R-mediated functions.<sup>5,8</sup> The Fc $\gamma$ RIIA type is expressed in platelets and most myeloid cells and presents an SNP resulting in arginine (R) or histidine (H) at position 131 in the membrane ectodomain that affects receptor affinity for IgG immunocomplexes.<sup>9</sup> The *-H131* allele presents higher affinity than the *-R131* allele for IgG1 and IgG2.<sup>5</sup> The Fc $\gamma$ RIIAA type is expressed predominantly on macrophages and natural killer cells and presents a functional SNP resulting in phenylalanine (F) or valine (V) at position 158.<sup>10</sup> The *-V158* allele binds more avidly to IgG1, IgG2, and IgG3 subclasses than to the *-F158* allele.<sup>5</sup> Besides being related to some autoimmune diseases, these polymorphisms have been shown to influence the clinical efficacy of biological therapies in neoplastic disorders, such as non-Hodgkin lymphoma (rituximab),<sup>7</sup> colorectal cancer (cetuximab),<sup>11</sup> and breast cancer (trastuzumab).<sup>12</sup> These polymorphisms also have been found to influence the response of biological therapy in autoimmune diseases. The Fc $\gamma$ RIIAA-V158F and Fc $\gamma$ RIIA-H131R polymorphisms have been found to

modify the outcome of patients with different types of autoimmune arthritis treated with anti-TNF agents.<sup>13,14</sup> Finally, Fc $\gamma$ RIIAA-V158F was related to the response to infliximab in patients with Crohn disease.<sup>15</sup>

Various biological agents have been used to treat psoriasis, of which anti-TNF agents are the most widely used. Infliximab (a chimeric monoclonal antibody), adalimumab (a human monoclonal antibody), and etanercept (a fusion protein) are all TNF blockers containing the Fc fragment of human IgG1 in their structure. Despite their differences in the Fc fragments (eg, etanercept does not have the C<sub>H</sub>1 domain), the 3 TNF blockers can bind the Fc $\gamma$ R system, especially in the presence of TNF.<sup>16</sup> In addition, all TNF blockers are able to induce ADCC in vitro.<sup>17</sup> Despite the proven therapeutic value of these treatments, they vary considerably in clinical efficacy, with 20% to 50% of patients not responding satisfactorily.<sup>18</sup> Few pharmacogenetic studies have assessed this issue, and no well-established clinical, laboratory, or genetic predictive markers are available.<sup>19-21</sup> Nonetheless, variability in genes encoding proteins involved in the immunological pathways of biological therapy may account for the differences observed in outcomes of anti-TNF treatment of psoriasis. The aim of this study was to assess the potential role of the Fc $\gamma$ RIIA-H131R and Fc $\gamma$ RIIAA-V158F polymorphisms in the clinical response to anti-TNF therapy in psoriasis to determine a potential pharmacogenetic marker of treatment response.

## Methods

### Patients

From January 1, 2007, through December 31, 2010, we included 70 white patients with psoriasis who attended 2 dermatology services in tertiary hospitals in Barcelona and received anti-TNF therapy (infliximab, adalimumab, or etanercept). All patients were 18 years or older and had moderate to severe psoriasis, defined as a Psoriasis Area and Severity Index (PASI) greater than 10 and a body surface area (BSA) greater than 10%. All patients had psoriasis refractory (or with contraindications) to at least 1 conventional systemic therapy, including methotrexate sodium, cyclosporine, acitretin, or phototherapy. Patients received anti-TNF monotherapy, were naive of any biological therapy, and completed at least 12 weeks of treatment. The dose for each biological agent consisted of the standard regimen for induction therapy (infliximab, 5 mg/kg for weeks 0, 2, and 6; etanercept, 50 mg twice a week; and adalimumab, 80 mg for the first week, 40 mg for the following week, and then 40 mg biweekly). Although patients were recruited in different hospitals and the outcome measures were evaluated by different physicians, all the evaluating physicians (J.M.C., C.F., and M.A.-G.) were members of the Spanish Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology and followed the same clinical criteria.<sup>22</sup> The ethics committees of the 2 hospitals approved the study protocol, and written informed consent was obtained from all participants before blood extraction for Fc $\gamma$ R genotyping.

### Clinical Assessment

Clinical and epidemiological data were retrospectively obtained from clinical medical records. The PASI and BSA were assessed at baseline and at treatment weeks 6 to 8 and 12 in all patients. Patients with an improvement in PASI of at least 75% at week 12 (PASI-75) were considered good responders. Treatment failure was defined as worsening of PASI or an improvement of less than 50% of the baseline PASI at week 12.

### FcγR Polymorphism Genotyping

Peripheral blood was extracted and leukocyte genomic DNA was purified using a commercially available DNA blood kit (Qiagen). The biallelic polymorphism FcγRIIA-H131R was assessed using a polymerase chain reaction (PCR) sequencing-based typing method. Briefly, a 367-base pair genomic DNA fragment was PCR amplified using specific primer pairs. The PCR reaction mix included 50 to 200 ng of DNA, 10 pmol of primers, 1 U of Taq DNA polymerase (Expand 20-kb PLUS; Roche Diagnostics GmbH), and 0.5 mM deoxyribonucleotide triphosphates diluted in buffer (Expand 20-kb PLUS) at a final volume of 20 mL. The cycling conditions included 1 cycle at 94°C for 5 minutes; 10 cycles at 94°C for 30 seconds, 65°C for 30 seconds, and 72°C for 60 seconds; 25 cycles at 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 60 seconds; and 1 cycle at 72°C for 7 minutes. Five microliters of the resulting amplicons were treated with reagent (ExoSAP-IT; USB Corporation) and directly sequenced using a cycle sequencing kit (Big-Dye Terminator, version 1.1; Applied Biosystems Inc) according to the manufacturer's instructions, with sense gene-specific primers. Sequencing reactions were analyzed by capillary electrophoresis in an automated single-capillary DNA sequencer (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems Inc). A previously reported allele-specific PCR method was used to genotype the biallelic functional FcγRIIA-V158F polymorphism with some modifications.<sup>23</sup> Amplicons were visualized by electrophoresis on agarose gel, ethidium bromide staining, and UV illumination.

### Statistical Analysis

Outcome measures were correlated with the FcγRIIA-H131R and FcγRIIA-V158F polymorphisms. Differences in the frequencies of genotypes in the groups of response were analyzed using the 2-tailed *t* test,  $\chi^2$  test, and Pearson product moment correlation test. The potential influence of clinical and epidemiological factors on the clinical outcome was evaluated by regression models.  $P \leq .05$  was considered significant. The statistical analysis was performed using commercially available software (SPSS, version 17.0; SPSS, Inc).

**Table 1. Epidemiological, Clinical, and Genetic Features of the Study Cohort**

Feature	Patients (n = 70)
Sex, No. (%)	
Male	52 (74)
Female	18 (26)
Age, mean (SD), y	45.8 (12.7)
Age at disease onset, mean (SD), y	26.2 (13.7)
Disease duration, mean (SD), y	17.4 (8.3)
Baseline PASI, mean (SD)	17.7 (11.1)
Baseline BSA, mean (SD), %	35.6 (19.4)
Genotypes, No. (%)	
FcγRIIA	
HH	16 (23)
HR	35 (50)
RR	19 (27)
FcγRIIA	
VV	9 (13)
VF	42 (60)
FF	19 (27)

Abbreviations: BSA, body surface area; F, phenylalanine; FcγR, Fcγ receptor; H, histidine; PASI, Psoriasis Area and Severity Index; R, arginine; V, valine.

## Results

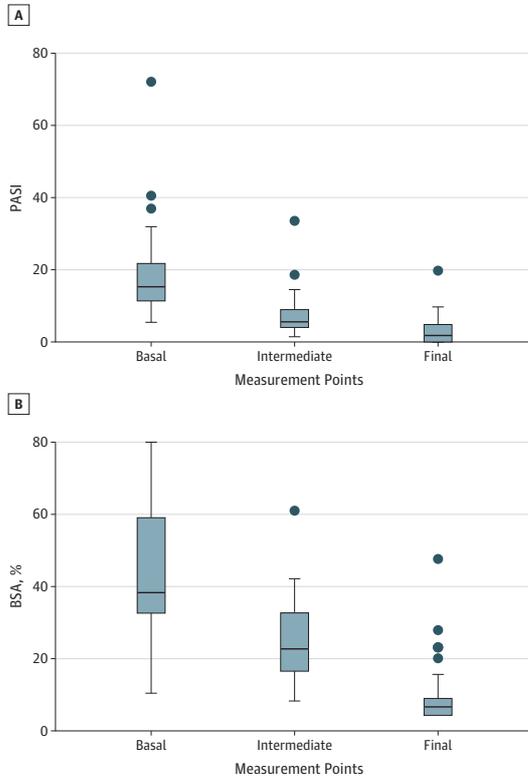
### Descriptive Study

The clinical, epidemiological, and genetic characteristics of our cohort are provided in **Table 1**. Sixty-two patients were men (74%), and the mean age of the patients was 45.8 years. Mean disease duration was 17.4 years. Etanercept was the most widely used anti-TNF therapy (38 patients [54%]), followed by adalimumab (18 [26%]), and infliximab (14 [20%]) (**Table 2**). A PASI-75 was achieved by 53 patients (76%) at week 12 (13 patients receiving infliximab [93%], 14 receiving adalimumab [78%], and 26 receiving etanercept [68%]). Frequencies of the FcγRIIA-H131R and FcγRIIA-V158F polymorphisms are also shown in **Table 1**. The frequencies of the genotypes of these polymorphisms were similar to those observed in the healthy Spanish population and were in Hardy-Weinberg equilibrium.<sup>24-28</sup> **Figure 1** illustrates the evolution of PASI and BSA over time. At the end of treatment, most patients experienced a notable improvement in PASI and BSA.

**Table 2. Anti-TNF Agents Used**

Agent	All Patients, No. (%)	PASI at Week 12	
		PASI-75	PASI <50
Etanercept	38 (54)	26 (68)	4 (11)
Adalimumab	18 (26)	14 (78)	2 (11)
Infliximab	14 (20)	13 (93)	0
<b>Total</b>	<b>70 (100)</b>	<b>53 (76)</b>	<b>6 (9)</b>

Abbreviations: PASI <50, PASI with improvement of less than 50%; PASI-75, Psoriasis Area and Severity Index with improvement of at least 75%; TNF, tumor necrosis factor.

**Figure 1. Box Plots of the Evolution of Psoriasis Measures During the Study**

A, Psoriasis Area and Severity Index (PASI) at baseline and at treatment weeks 6 to 8 (intermediate) and 12 (final). B, Body surface area (BSA) at the same points. The horizontal line in the middle of each box indicates the median, while the top and bottom borders of the box mark the 75th and 25th percentiles, respectively. The whiskers above and below the box mark the 90th and 10th percentiles. The points beyond the whiskers are outliers beyond the 90th or 10th percentile.

### Correlation Between Genotypes of FcγR Polymorphisms and Outcome Measures

The bivariate analysis is shown in **Table 3**. Outcome measures were correlated with genotypes, which were pooled with regard to the presence of high-affinity alleles. At week 12, we observed a higher likelihood of achieving PASI-75 and a greater improvement in PASI and BSA in patients homozygous for low-

affinity alleles of both SNPs, although these differences were not significant. We also analyzed the response to treatment over time for each polymorphism (**Figure 2**). Significant differences were found in the intermediate BSA (6-8 weeks) with regard to the studied polymorphisms. Patients harboring high-affinity alleles (ie, *HH131 + HR131* and *VV158 + VF158*) had a lower mean intermediate BSA than did patients presenting only low-affinity alleles. These differences were not observed in the intermediate PASI values.

### Multivariate Analysis

We performed a multivariate analysis to determine whether the significant association found between the presence of high-affinity alleles in the genotypes of the 2 SNPs and lower intermediate BSA was independent or was influenced by other confounding factors that could affect the outcome of treatment. The regression models provided in **Table 4** demonstrate that the presence of high-affinity alleles in the genotype remained significantly associated with a better BSA intermediate response regardless of age, sex, the efficacy of the anti-TNF agent used (measured as the percentage of PASI improvement), and initial BSA. To analyze the potential combined effect of the 2 SNPs, we also analyzed the haplotype by calculating the number of high-affinity alleles, ranging from 0 to 4, where 0 indicates the presence of non-high-affinity alleles (RRFF) and 4, the presence of 4 high-affinity alleles in the haplotype (HHVV). We analyzed the number of high-affinity alleles in the haplotype in a regression model that showed that the higher the number of high-affinity alleles, the better the intermediate response to therapy, suggesting that these SNPs act additively in the same immunological pathway of the mechanism of action of anti-TNF therapy. Finally, we performed multivariate analysis for final PASI and final BSA, but we found no significant associations (**Table 4**).

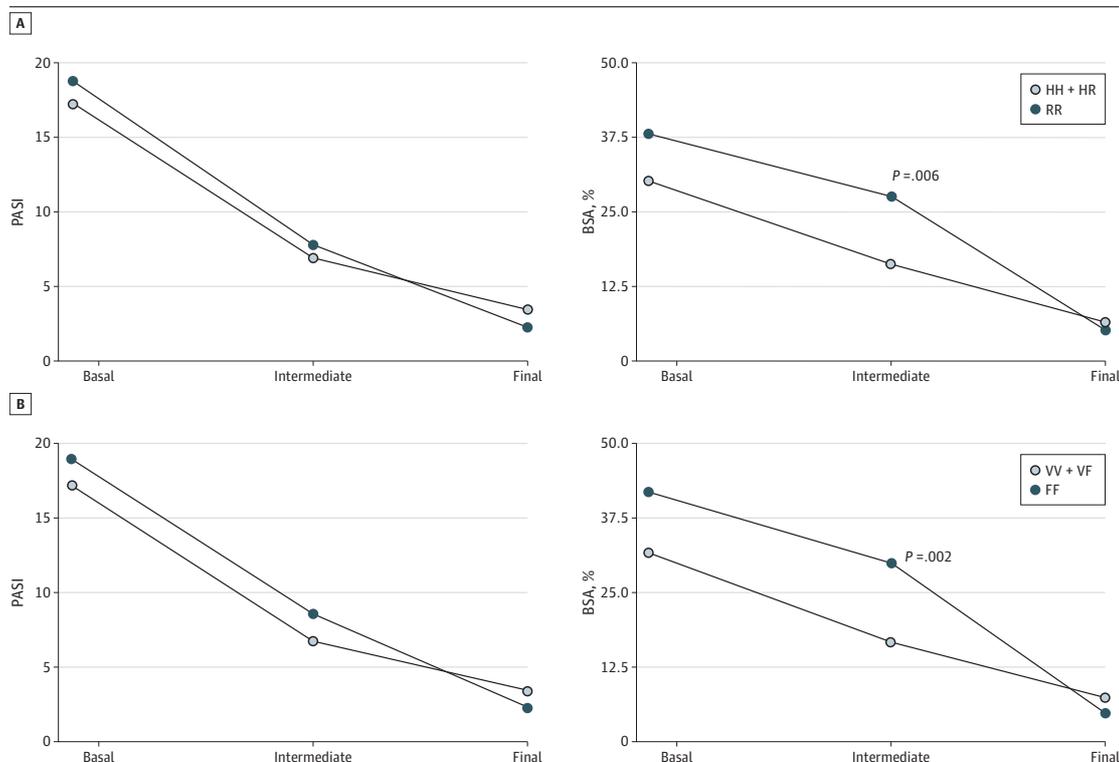
### Discussion

Considering that the rationale for the efficacy of anti-TNF agents relies partly on the actions exerted by the Fc portion of their structure, we studied the possible association between 2 functional SNPs of FcγRs and the response to these therapies. We determined the response to treatment using validated outcome measures at different time points in 70 patients with moderate to severe psoriasis who underwent anti-

**Table 3. Bivariate Analysis Showing the Frequency of FcγRIIA-H131R and FcγRIIA-V158F Pooled Genotypes According to the Response to Anti-TNF Therapy at Week 12**

Response	FcγRIIA-H131R		P Value	FcγRIIA-V158F		P Value
	HH + HR	RR		VV + VF	FF	
PASI-75, No. (%)	34 (71)	14 (82)	.52	34 (69)	16 (89)	.13
Mean PASI improvement, %	78.5	86.3	.19	79.2	86.0	.25
PASI <50, No. (%)	6 (13)	0	.18	6 (13)	0	.33
Mean BSA improvement, %	76.5	78.7	.80	73.8	82.6	.30

Abbreviations: See Tables 1 and 2.

**Figure 2. Change in Psoriasis Measures Over Time According to the Pooled Genotypes of Fc $\gamma$  Receptor (Fc $\gamma$ R) Polymorphisms**

A, The Fc $\gamma$ RIIA-H131R polymorphism. Change is measured with the Psoriasis Area and Severity Index (PASI) and body surface area (BSA) at baseline and at treatment weeks 6 to 8 (intermediate) and 12 (final). H indicates histidine; R,

arginine. B, The Fc $\gamma$ RIIA-V158F polymorphism. Change is measured with the PASI and BSA at the same time points. F indicates phenylalanine; V, valine.

TNF therapy for the first time and correlated the responses with the genotypes of the Fc $\gamma$ RIIA-H131R and Fc $\gamma$ RIIA-V158F polymorphisms.

First, we found a nonsignificant association between achievement of PASI-75 and BSA and PASI improvement and the low-affinity genotypes -RR131 and -FF158 at week 12. Second, we analyzed the influence of Fc $\gamma$ R polymorphisms on the response to therapy over time and found that the presence of high-affinity alleles of Fc $\gamma$ RIIA-H131R and Fc $\gamma$ RIIA-V158F were significantly associated with a lower BSA in the intermediate point of treatment. These associations retained significance

in the multivariate study regardless of sex, age, the efficacy of the anti-TNF agent used, and the initial BSA. Because both polymorphisms seemed to act in the same direction, we decided to analyze them together. To gain statistical power and solve the problem of having few examples of some haplotypes, we analyzed the total number of high-affinity alleles in the haplotype. A linear regression model showed a significant inverse association between the number of high-affinity alleles in the haplotype and intermediate BSA values, suggesting that both polymorphisms may act through the same immunological pathways. The simultaneous action of high-

**Table 4. Multivariate Linear Regression Models**

Explanatory Variable <sup>a</sup>	Dependent Variable <sup>b</sup>					
	Intermediate BSA		Final BSA		Final PASI	
	$\beta$ Coefficient	P Value <sup>c</sup>	$\beta$ Coefficient	P Value	$\beta$ Coefficient	P Value
Fc $\gamma$ RIIA, HR+RR vs HH	0.372	.03	0.025	.78	-0.017	.77
Fc $\gamma$ RIIA, VV+VF vs FF	0.425	.02	0.012	.90	-0.025	.69
No. of high-affinity alleles in the haplotype	-0.391	.04	-0.024	.80	0.004	.95

Abbreviations: See Table 1.

<sup>a</sup> Adjusted by age, sex, initial BSA, and the efficacy of the anti-tumor necrosis factor agent (percentage of PASI improvement).

<sup>b</sup> Intermediate indicates treatment weeks 6 to 8; final, treatment week 12.

<sup>c</sup> Differences were statistically significant. The initial BSA and percentage of PASI improvement were significant in all models.

affinity alleles of FcγIIA-H131R and FcγRIIA-V158F might lead to enhanced ADCC of pathogenetically relevant cells expressing TNF on their membranes, producing a more rapid clinical response. In fact, ADCC-mediated apoptosis of TNF-bearing cells by natural killer cells and macrophages has been pointed out as a relevant mechanism of action of TNF blockers in psoriasis.<sup>29</sup> Our results therefore suggest a pharmacodynamic effect of the Fcγ polymorphisms studied in the early phases of treatment. However, we could only detect such association with the intermediate BSA values and not with the PASI. This enhanced ADCC-driven mechanism might induce a faster clearance of milder lesions than those with higher scores of erythema, infiltration, and desquamation, leading to a more significant improvement in the BSA than in the PASI at this point of treatment.

Although we found no significant differences, patients with low-affinity genotypes achieved a better response than those with high-affinity genotypes at the end of the treatment, suggesting that low-affinity alleles, which may be producing lower levels of Fcγ-mediated drug clearance, may be pharmacokinetically relevant in further stages of the treatment. In fact, a pharmacokinetic study has shown that patients with RA with low-affinity alleles in their genotypes (ie, -131RR and -158FF) presented low-level clearance of infliximab and disease control with low-dose infliximab.<sup>30</sup>

The Fcγ polymorphisms analyzed in our study have been linked to the response to anti-TNF therapy in rheumatological diseases in clinical studies.<sup>13,14,31</sup> Tutuncu et al<sup>14</sup> observed a better response to 3 months of infliximab, adalimumab, or etanercept treatment in 35 patients with RA or psoriatic arthritis who presented the low-affinity genotype FcγRIIA-V158F. The authors suggested that Fcγ-mediated clearance of biological agents by phagocytes would be impaired owing to the presence of low-affinity receptors, thus increasing the half-life of the agent and its efficacy. More recently, Cañete et al<sup>13</sup> detected an association between the low-affinity geno-

types of the FcγRIIA-H131R and FcγRIIA-V158F polymorphisms and a better response to infliximab in patients with RA at different time points. Patients with the -FF158 genotype presented better values for joint involvement at week 6, and those with the -RR131 genotype at week 20. Finally, Morales-Lara et al<sup>31</sup> studied the role of FcγRIIA-V158F in the response to infliximab in patients with RA, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. The results confirmed those of Cañete et al<sup>13</sup> with regard to RA but also found that the high-affinity -V158 allele was associated with a better response to infliximab in patients with ankylosing spondylitis. These data, taken together, suggest that the influence of Fcγ polymorphisms in the response to anti-TNF may depend not only on the time point of treatment but also on immunopathological factors specific for each disease.

The limitations of our study include the retrospective recording of data, the small sample size, and the lack of analysis of some factors that may have influenced the outcome, such as weight, drug blood levels, or the presence of anti-drug antibodies. Further studies taking these factors into account and using a longer follow-up and larger cohorts are needed to confirm our preliminary results to establish robust pharmacogenetic markers that could help physicians to improve the management of psoriasis in patients treated with anti-TNF agents. In particular, a study with a follow-up of at least 1 year may shed light on how low-affinity alleles affect plasma levels of the drug and thus the clinical efficacy.

Despite the limitations mentioned, we have tried to analyze the potential relationship between FcγRIIA-H131R and FcγRIIA-V158F polymorphisms and the response to anti-TNF therapy in psoriasis. Our results seem to point to an initial pharmacodynamic effect powered by the simultaneous effect of the high-affinity alleles of these polymorphisms. These results might help dermatologists in guiding therapeutic decisions, especially in very severe cases where a quick response is needed.

#### ARTICLE INFORMATION

**Accepted for Publication:** March 3, 2013.

**Published Online:** July 31, 2013.  
doi:10.1001/jamadermatol.2013.4632.

**Author Affiliations:** Department of Dermatology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain (Julià, Guilabert, Alsina-Gibert, Mascaró); Department of Immunology, Hospital Clínic, Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain (Lozano, Suarez-Casasús); Section of Cell Biology, Department of Immunology and Neuroscience, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain (Lozano); Department of Dermatology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain (Suarez-Casasús, Carrascosa, Ferrándiz); Institut Català de la Salut, Servei d'Atenció Primària Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain (Moreno); Laboratory of Immunobiology for Research and Application to Diagnosis, Tissue and Blood Bank, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain (Pedrosa); Department of Cell Biology, Physiology and Immunology,

Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain (Pedrosa).

**Author Contributions:** All authors had full access to all the study data and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Drs Julià and Guilabert contributed equally to this work.

**Study concept and design:** Julià, Guilabert, Lozano, Mascaró.

**Acquisition of data:** Julià, Lozano, Suarez-Casasús, Carrascosa, Ferrándiz, Pedrosa, Alsina-Gibert.

**Analysis and interpretation of data:** Julià, Guilabert, Moreno, Carrascosa, Ferrándiz, Mascaró.

**Drafting of the manuscript:** Julià, Guilabert, Lozano, Suarez-Casasús.

**Critical revision of the manuscript for important intellectual content:** Julià, Moreno, Carrascosa, Ferrándiz, Pedrosa, Alsina-Gibert, Mascaró.

**Statistical analysis:** Guilabert, Moreno.

**Administrative, technical, or material support:** Julià, Lozano, Suarez-Casasús, Pedrosa.

**Study supervision:** Julià, Lozano, Carrascosa, Ferrándiz, Mascaró.

**Conflict of Interest Disclosures:** None reported.

**Funding/Support:** This study was supported by grants from the Hospital Clínic de Barcelona (Premi Fi de Residència Emili Letang [Dr Julià]) and Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo de España (Dr Guilabert). Part of the samples used in this work belong to the IGTP-HUGTP Biobank and were handled in cooperation with and thanks to the support of Instituto de Salud Carlos III (reference RD09/0076/0010).

#### REFERENCES

1. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;361(5):496-509.
2. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2009;373(9664):659-672.
3. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369(9573):1641-1657.
4. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2008;359(6):613-626.

## IX. ANEXO II

### 1. Relación de contribuciones realizadas por el doctorando relacionadas con la Tesis Doctoral

#### 1.1. Publicaciones en Revistas Indexadas

- **Julià M**, Consuegra-Fernández M, Guilabert A, Muñoz C, Esteve A, Armiger-Borràs N, Santiago F, Arias MT, Romaní J, Ferrándiz C, Carrascosa JM, Pedrosa E, Alsina-Gibert M, Lozano F, Mascaró-Galy JM. Genetically defined variants of toll-like receptors 3, 7 and 9 as phenotype and risk modifier factors for Psoriasis. *Journal of Dermatologic Science* 2018; 89:301-304.
- Romaní J, **Julià M**, Lozano F, Muñoz-Santos C, Guilabert A, Carrascosa JM, Rigla M, Luelmo J. *Toll*-like receptor 9 promoter polymorphism as a predictive factor of narrow-band UVB phototherapy response in patients with Psoriasis. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine* 2015; 31:98–103.
- Consuegra-Fernández M, **Julià M**, Martínez-Florensa M, Aranda F, Català C, Armiger-Borràs N, Arias MT, Santiago F, Guilabert A, Esteve A, Muñoz C, Ferrándiz C, Carrascosa JM, Pedrosa E, Romaní J, Alsina M, Mascaró-Galy JM and Lozano F. Genetic and experimental evidence for the involvement of the CD6 lymphocyte receptor in Psoriasis. *Cell Mol Immunol.* 2018; 15:898-906
- **Julià M**, Guilabert A, Lozano F, Suarez-Casasús B, Moreno N, Carrascosa JM, Ferrándiz C, Pedrosa E, Alsina M and Mascaró-Galy JM. The role of Fcγ receptor polymorphisms in the response to anti-tumor necrosis factor therapy in Psoriasis: A pharmacogenetic study. *JAMA Dermatology* 2013; 149:1033-9

#### 1.2. Presentaciones en Congresos y Reuniones Científicas

- **Marc Julià MD**, Antonio Guilabert MD, Belén Suarez-Casasús, Mercè Alsina MD, Juan De Dios Cañete MD, Carlos Muñoz MD, Francisco Lozano MD, José Manuel Mascaró Jr. MD. Póster “Estudio Retrospectivo Sobre El papel de los polimorfismos genéticos del receptor de la fracción constante de la inmunoglobulina

- G (Fc-gamma) en el tratamiento biológico de la psoriasis”. II Simposium Nacional de Psoriasis Innovara, Mallorca 23 Octubre de 2010 (3º Premio).
- **M Julià** . Ponencia “Psoriasis i immunitat innata: Estudi del paper dels Toll-like receptors i del receptor Fc-gamma en la severitat i la resposta al tractament” en el Institut Clínic de Medicina i Dermatologia del Hospital Clínic de Barcelona, 1 de abril 2015.
  - **M Julià**. Ponencia “Papel de los polimorfismos genéticos de los receptores Toll-like en la psoriasis. 1º Congreso de Psoriasis – Reunión del Grupo de Psoriasis de la AEDV, Madrid 23 enero 2016.
  - **Marc Julià**, Marta Consuegra-Fernández, Mario Martínez-Florensa, Fernando Aranda, Cristina Català, Noelia Armiger-Borràs, María-Teresa Arias, Francisca Santiago, Antonio Guilabert, Anna Esteve, Carlos Muñoz, Carlos Ferrándiz, José Manuel Carrascosa, Edurne Pedrosa, Jorge Romaní, Mercè Alsina, José Manuel Mascaró-Galy y Francisco Lozano. Póster “Receptor linfocítico CD6 y psoriasis: evidencia genética y experimental”. 3º Congreso de Psoriasis – Reunión del Grupo de Psoriasis de la AEDV, Madrid 20 enero 2018.
  - **M. Julià**, M. Consuegra-Fernández, M. Martínez-Florensa, F. Aranda, C. Català, N. Armiger-Borràs, MT. Arias, F. Santiago, A. Guilabert, A. Esteve, C. Muñoz, C. Ferrándiz, JM. Carrascosa, E. Pedrosa, J. Romaní, M. Alsina, JM. Mascaró-Galy y F. Lozano. Poster “Genetic, experimental and in vitro evidence of the relevant role of the lymphocytic receptor CD6 in psoriasis”. 27<sup>th</sup> EADV Congress, Paris 12-16 septiembre 2018.
  - **M Julià**. Ponencia “Receptor linfocítico CD6 y psoriasis: evidencia genética, experimental e *in vitro* de su implicación fisiopatogénica”. X Simposium Nacional de Psoriasis Innovara, Valencia 20 Octubre 2018 (1º Premio a la mejor comunicación).
  - **Julià M**, Consuegra-Fernández M, Guilabert A, Muñoz C, Esteve A, Armiger-Borràs N, Santiago F, Arias MT, Romaní J, Ferrándiz C, Carrascosa JM, Pedrosa E, Alsina-Gibert M, Lozano F, Mascaró-Galy JM Ponencia “Trabajo investigación propio 2: Genetically defined variants of toll-like receptors 3, 7 and 9 as phenotype and risk modifier factors for psoriasis. J Dermatol Sci. 2018 Mar;89(3):301-304”. 4º Congreso de Psoriasis – Reunión del Grupo de Psoriasis de la AEDV, Madrid 18 enero 2019.

