

Estudio morfométrico comparativo del tratamiento con Calcipotriol y anticuerpo monoclonal ior t₁ tópico en pacientes psoriáticos

Yadira Morera Castro, Juana Delgado García,* Lucía González Núñez, José Enrique Montero Casimiro,** Blanca Rosa Tormo Bravo,** Contreras Daniel Barrionuevo,* Leopoldina Falcón Lincheta,* Olga Torres.**

Dpto. de Anatomía-Patológica, Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch López", Avenida 26 y Avenida de Independencia, Plaza, Apartado Postal 1400. *Hospital Docente "Carlos J. Finlay". **Centro de Inmunología Molecular, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 7 de junio de 1999. Aceptado: 17 de noviembre de 1999.

Palabras clave: psoriasis, morfometría, Calcipotriol, anticuerpo monoclonal.
Key words: psoriasis, morphometry, Calcipotriol, monoclonal antibody.

RESUMEN. La psoriasis es una enfermedad autoinmune caracterizada por hiperplasia, infiltrado inflamatorio y diferenciación anormal de los queratinocitos epidérmicos en la piel, con predominio de linfocitos T activados CD₄ y CD₈ positivos. El anticuerpo monoclonal ior t₁ es un anti CD₈ que tiene efecto inmunosupresor al disminuir los linfocitos T en piel y sangre periférica, es un anticuerpo monoclonal IgG 2a murino que reconoce un epítipo diferente comparado con otros anticuerpos monoclonales anti CD₈. El Calcipotriol es un análogo de la vitamina D₃, efectivo en la inhibición de la proliferación de queratinocitos humanos, así como modulador de la respuesta inmune de linfocitos T que contribuye con gran efectividad en el tratamiento de la psoriasis vulgar. Se comparó el empleo del anticuerpo monoclonal ior t₁ y del Calcipotriol en lesiones psoriáticas para ver su efecto inmunomodulador y los cambios histológicos que produce. Se crearon de forma aleatoria y a doble ciegos, dos grupos de 14 pacientes cada uno según fueron tratados con ior t₁ o Calcipotriol. La terapia se aplicó de forma tópica (jalea base y Calcipotriol) dos veces al día, durante un período de 21 d. Se hicieron estudios histopatológicos de la biopsia inicial y a los 21 d de tratamiento. Se realizaron análisis morfométricos mediante un método de procesamiento digital de imágenes. La piel de los pacientes tratados con ior t₁ mostró una notable mejoría morfológica con reducción marcada del grosor de la epidermis y todos presentaron una disminución del infiltrado de células linfocitarias en la unión dermo-epidérmica.

ABSTRACT. Psoriasis is an autoimmune disease, characterized by hyperplasia, inflammatory infiltration and abnormal differentiation of epidermal keratinocytes in the skin with predominance of activated T lymphocytes of CD₄ and CD₈ phenotypes. The ior t₁ monoclonal antibody anti CD₈ is a murine IgG 2a mAb recognizing a different epitope compared to the other anti CD₈ mAb. Calcipotriol is a vitamin D₃ analogue, effective for the induction of differentiation and inhibition of proliferation of human keratinocyte cultures and modulates the immune responses of T lymphocytes, constituting a safe and effective treatment for chronic plaque psoriasis. Now it compares ior t₁ mAb and Calcipotriol treatments in psoriasis, their immunomodulating effects as well as the histological changes induced by them in psoriatic lesions. This was a prospective randomized double-blind trial scheduled in two groups of fourteen patients each one receiving either the Calcipotriol ointment or ior t₁ mAb. The topical therapeutic formulation (jelly and Calcipotriol) was applied daily, twice a day during 21 d. Histological analysis of biopsies from cutaneous lesions were performed at the beginning and finishing the treatment by one morphometric analyses digital imaging procedures. The treatment with ior t₁ showed an improvement of the patients' skin morphology as a result of noticeable decrease in thickness of the epidermis. Additionally, all the patients treated with ior t₁ showed an improvement as a result of the decrease in infiltrating lymphoid cells in the epidermis and epidermis-dermis union. Nevertheless, this indication of effectiveness in treatment ior t₁ mAb should be corroborated in a larger number of patients.

INTRODUCCION

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica epidermo-proliferativa que se caracteriza desde el punto de vista clínico, por presentar lesiones maculares y maculopapulosa, recubiertas por escamas estratificadas, plateadas, que de manera gradual o de forma aguda coalescen para formar placas de formas variadas. Se presenta por igual en ambos sexos aunque en la mujer suele iniciarse más tempranamente que en el hombre, no presenta predilección racial.¹⁻³ Desde el punto de vista histopatológico, se caracteriza por hiperproliferación epidérmica e infiltrado inflamatorio con predominio de linfocitos T activados en la dermis y la epidermis.

Teniendo en cuenta los resultados de investigaciones previas en las que se corroboró la importancia de los linfocitos T y los queratinocitos en los mecanismos fisiopatológicos de la psoriasis, así como importantes resultados terapéuticos y toxicológicos relacionados con el anticuerpo monoclonal ior t₁, este trabajo se propuso realizar un estudio comparativo con pacientes tratados con este anticuerpo y con Calcipotriol, compuesto que según se ha demostrado en estudios controlados, garantiza un tratamiento seguro y eficaz para esta enfermedad.

Los avances inmunológicos en el campo de la etiopatogenia de la pso-

riasis han revelado que los linfocitos TCD₄ están activados en el inicio de la enfermedad en la dermis y epidermis, mientras que los linfocitos TCD₈ lo hacen en la fase resolutoria.⁹

La remisión de esta entidad clínica puede producirse si disminuye el número de estas células en la piel, por lo que se sugiere que desempeñan un papel en la perpetuación de la enfermedad⁶⁻⁸ al liberar mediadores solubles de respuesta inmune capaces de inducir la proliferación de queratinocitos responsables de las manifestaciones clínicas en la psoriasis. Esto favorece el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas^{9,10} a la regulación de las células del sistema inmune que intervienen en el establecimiento de esta enfermedad tanto sobre linfocitos T como sobre los queratinocitos.¹¹⁻¹⁴

En el Centro de Inmunología Molecular La Habana, Cuba, se produce el anticuerpo monoclonal ior t₁ de isotipo IgG 2a, clasificado como anti CD₈, que tiene un efecto inmunosupresor al provocar una disminución importante de linfocitos T en piel y en sangre periférica.

El Calcipotriol es una formulación tópica de un derivado de la vitamina D (análogo sintético de la biológicamente activa 1,25-dihidroxi vitamina D₃), el cual suprime la proliferación de los queratinocitos, normalizando la proliferación celular anormal en la piel psoriática, además, puede actuar inhibiendo la producción de citoquinas por los queratinocitos o linfocitos con efecto terapéutico superior a los esteroides tópicos en psoriasis vulgar.

Se refiere que la vitamina D₃ tiene efectos sobre el sistema inmunológico, inhibiendo directamente la interleucina 2 e indirectamente la síntesis de Ig a través de los linfocitos T y B activados, por lo que muchos recomiendan que el Calcipotriol tópico debe integrar la primera línea de tratamiento de la psoriasis.¹⁴

Teniendo en cuenta la experiencia con el anticuerpo monoclonal ior t₁, es que se realiza esta investigación comparándolo con el Calcipotriol.

Este trabajo se propuso como objetivos comparar la eficacia terapéutica entre el Calcipotriol y el anticuerpo monoclonal ior t₁ en pacientes con psoriasis vulgar y determinar la eficacia terapéutica relativa, seguridad y aceptabilidad de ambas formulaciones.

MATERIALES Y METODOS

Se incluyeron en esta investigación 28 pacientes mayores de 16 años

y menores de 75 procedentes de la consulta de Dermatología del hospital docente Dr. "Carlos J. Finlay" con diagnóstico clínico y anatómo-patológico de psoriasis vulgar, con recidiva de la enfermedad en fase aguda, con distribución simétrica de las lesiones, sin haber utilizado por lo menos en 4 semanas previas tratamiento esteroideo tópico o sistémico u otro tipo de medicamento que pudiera afectar el curso de la enfermedad.

Se constituyeron de forma aleatoria y a doble ciegas dos grupos de 14 pacientes cada uno. A un grupo se le aplicó el tratamiento con ior t₁ y al otro, con Calcipotriol.

Se tomó en cada paciente una biopsia inicial previa al tratamiento (una semana antes) en forma de tajada de melón en el borde externo de una lesión característica y otra biopsia a los 21 d de una zona aledaña a la inicial. La pieza se dividió en dos partes, una para coloración con hematoxilina y eosina y otra para estudios inmuno-histoquímicos.

Sobre criosecciones de piel conservadas en nitrógeno líquido, se evaluó la penetrabilidad del anticuerpo monoclonal ior t₁ y se determinó su presencia en la piel unido a los linfocitos, incubando las muestras en conjugado de carnero anti Ig murinas biotinilado y complejo biotina-avidina-peroxidasa (DAKO). Se utilizó además, el anticuerpo monoclonal ior t₁ en paralelo con otros similares contra CD de linfocitos T, ior t₂ (anti CD₃) ior t₃ (anti CD₄) ior t₄ (anti CD₈) ior t₅ (anti CD₄₅) ior Drl (anti HLA DR), CD₅₆ y CD₈.

En el análisis comparativo se realizaron estudios morfométricos mediante un sistema de procesamiento digital de imágenes en tres pacientes seleccionados al azar de cada grupo.

Se midió el grosor de la epidermis, capa córnea y mucosa de Malpighio en tres campos diferentes de cada biopsia a partir de cinco mediciones en cada campo. Se hizo el conteo de todas las células marcadas con los distintos monoclonales en tres campos diferentes en todas las biopsias, en la epidermis, unión dermoepidérmica y dermis. Las medidas fueron automáticamente almacenadas en una base de datos para su análisis mediante un paquete estadístico incluido en el programa.

Presentación de los productos

El anticuerpo monoclonal ior t₁ para uso tópico se presenta en for-

ma de jalea terapéutica convencional para estos fines (Industria Médica Farmacéutica, La Habana) y se compone de 3 mg de anticuerpo monoclonal por gramo de jalea.

El Calcipotriol se presenta en forma de pomada en la que cada gramo contiene 50 µg de él y se presenta en envases de 30 g.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizaron estudios histopatológicos en todos los pacientes y morfométrico en tres pacientes tratados con Calcipotriol y con anticuerpo monoclonal ior t₁, seleccionados al azar.

Estudio histológico

Tratamiento con Calcipotriol

No hubo evidencias de variación en el grosor de la epidermis al comparar los resultados antes y después del tratamiento (Fig. 1).

Tratamiento con anticuerpo monoclonal ior t₁

Se observó una marcada reducción del grosor de la epidermis en dos de los tres pacientes analizados (Fig. 1). En el tercer paciente este efecto ocurrió a expensas fundamentalmente de la capa mucosa de Malpighio (Fig. 2) porque la capa córnea se observó aumentada después del tratamiento (Fig. 3).

En el primer paciente se observó una menor disminución del grosor de la epidermis, sin embargo, la capa córnea disminuyó notablemente (Figuras 1 y 3).

Estudio inmunohistoquímico

Tratamiento con anticuerpo monoclonal ior t₁

a) Epidermis y unión dermoepidérmica

Se observó una marcada disminución del número de células inflamatorias leucocitarias en la biopsia post-tratamiento (Figuras 4 y 5).

La expresión de los marcadores de los linfocitos T (CD₃) descendió a cero en los dos primeros pacientes y en el tercero, se redujo considerablemente (este paciente era el que mayor cantidad de células linfoides presentó por área en la biopsia realizada previamente al tratamiento) (Tabla 1).

b) Dermis

Se observó una considerable disminución de células inflamatorias linfoides y esta expresión fue también evaluada por marcadores leucocitarios en la biopsia post-tratamiento en los dos primeros pacien-

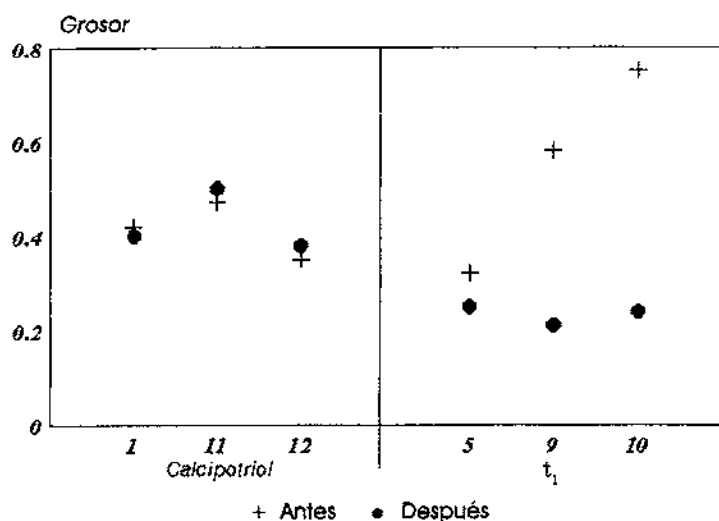


Fig. 1. Media aritmética del grosor de la epidermis correspondiente a pacientes psoriáticos tratados con Calcipotriol y t_1 .

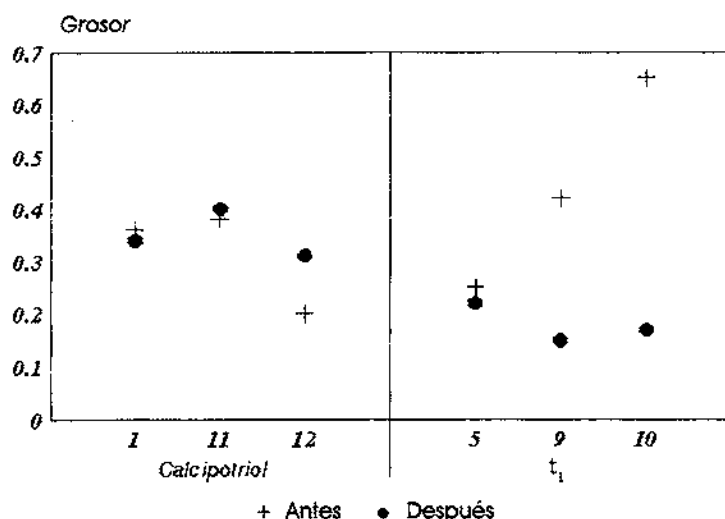


Fig. 2. Media aritmética del grosor de la capa de mucosa de malpighio correspondiente a pacientes psoriáticos tratados con Calcipotriol y t_1 .

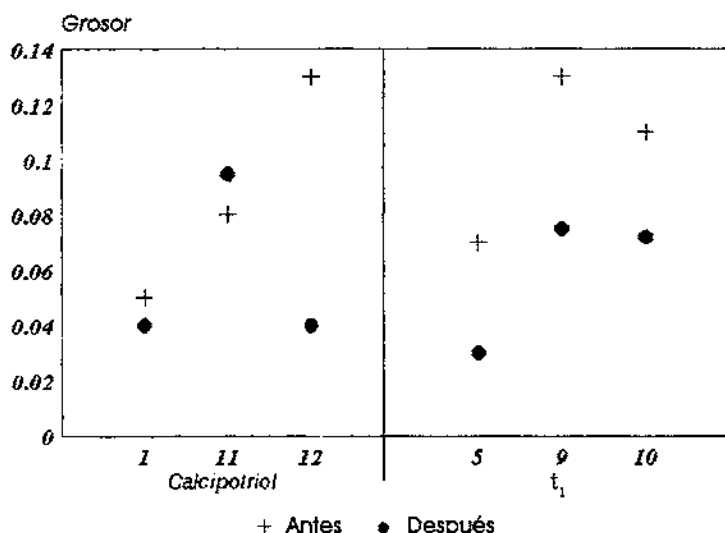


Fig. 3. Media aritmética del grosor de la capa córnea correspondiente a pacientes psoriáticos tratados con Calcipotriol y t_1 .

tes (Fig. 6). Con el tercero que presentó mayor infiltrado leucocitario previo al tratamiento no ocurrió esto, sin embargo, la expresión de los marcadores leucocitarios decreció más incluyendo el marcador CD_6 (Fig. 6). La expresión de los marcadores CD_3 , L_3 (CD_{45}), T_8 (CD_8) no cambió de forma significativa en el tercer paciente (Tabla 1).

Tratamiento con Calcipotriol

Se observó un incremento notable del infiltrado de leucocitos en la dermis en dos pacientes (Fig. 7 y Tabla 2). En el otro, hubo reducción del infiltrado en tres áreas de las cinco evaluadas en la biopsia post-tratamiento expresado con marcadores leucocitarios (Figuras 8 y 9 y Tabla 2).

CONCLUSION

El tratamiento con el anticuerpo monoclonal ior t_1 ofrece una mejoría morfológica en la piel de los pacientes portadores de psoriasis con decrecimiento notable del grosor de la epidermis, así como disminución del infiltrado leucocitario, al compararlo con los pacientes tratados con Calcipotriol.

La efectividad del tratamiento con ior t_1 fue corroborada en mayor número de casos.

BIBLIOGRAFIA

1. Roenigk H., Psoriasis, *J. Dermatol.*, 5, 611, 1985.
2. Anderson T.F. Psoriasis, Manifestaciones clínicas. Enfermedades relacionadas. Diagnóstico diferencial. Patogenia y tratamiento de las enfermedades dermatológicas, Editorial Mosby, San Luis, USA, 745-765, 1982.
3. Mihatsch M.J. Consensus conference on cyclosporin a for psoriasis, *J. Dermatol.*, 126, 621, 1992.
4. Poizat-Martin I. Are CD_4 antibodies peptide T new treatments for psoriasis? *Lancet*, 337, 1477, 1991.
5. Fry L. Psoriasis immunopathology and long-term treatment with cyclosporin. *J. Autoimmun.* Suppl. A(5), 277, 1992.
6. Bota C.M. Activation of human T cells through CD_6 : functional effects of a novel anti- CD_6 monoclonal antibody and definition of four epitopes of the CD_6 glycoprotein. *International Immunol.*, 5, 783, 1993.
7. Dhavalikumar D.P. Identification and Characterization of a 100-KD Ligand for CD_6 on Human Thymic Epithelial Cells, *J. Exp. Med.*, 181, 1563, 1995.
8. Osorio L.M. The anti- CD_6 mAb, ior- t_1 , defined a new epitope on the human CD_6 molecule that induces greater responsiveness in T cell receptor. CD_3 -mediated T cell proliferation, *Cell. Immunol.*, 154, 123, 1994.

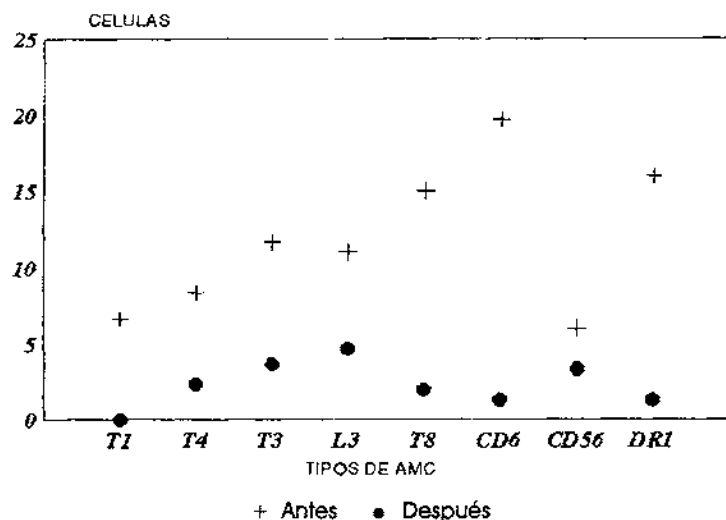


Fig. 4. Cantidad de células marcadas con AMC en la epidermis correspondiente a pacientes psoriáticos tratados con AMC t_1 .

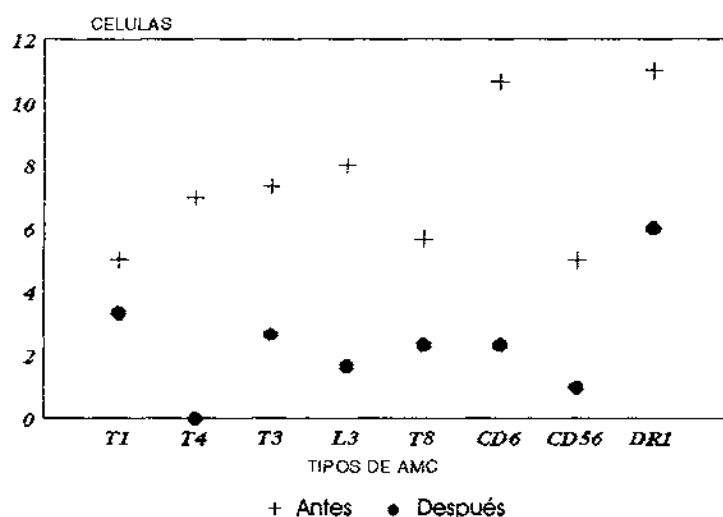


Fig. 5. Cantidad de células marcadas con AMC en la unión de dermis-epidermis correspondiente a pacientes psoriáticos tratados con AMC t_1 .

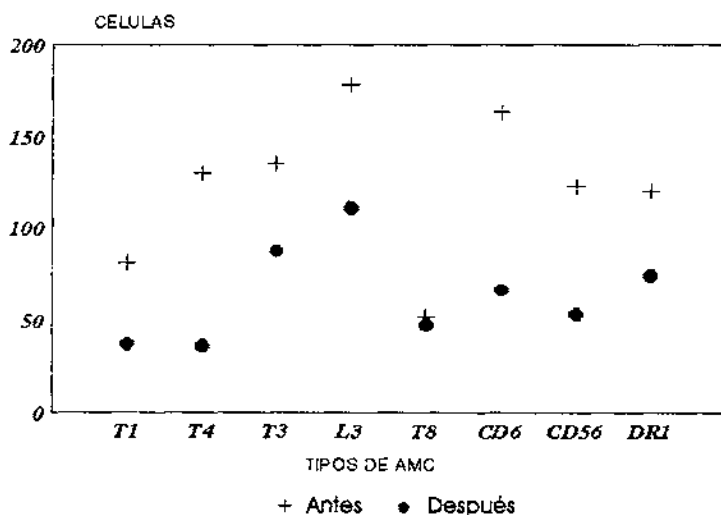


Fig. 6. Cantidad de células marcadas con AMC en la dermis correspondiente a pacientes psoriáticos tratados con AMC t_1 .

8. Berth-Jones J. Vitamin D analogues and psoriasis? *Brit. J. Dermatol.*, 127, 71, 1992.
10. Faxas M.E. Estudios de la modulación antigénica por los anticuerpos monoclonales (ACM) anticélulas faxas, m.e. *Biotecnología Aplicada*, 7, 66, 1990.
11. Tormo B. inmunohistopatological monitoring of cutaneous t-cell lymphomas treated with topic t_1 (anti CD_4) monoclonal antibody. *Biotecnología Aplicada*, 10, 18, 1993.
12. García C.A., Topical treatment of cutaneous T-cell lymphoma skin lesions with the mouse anti CD_4 monoclonal antibody t_1 . *Biotecnología Aplicada*, 7, 176, 1990.
13. Sagaró B. Utilización del anticuerpo monoclonal t_1 para el tratamiento de los linfomas cutáneos de células. *Biotecnología Aplicada*, 10, 19, 1993.
14. Kragballe K. Vitamin analogues in the treatment of psoriasis. *J. Cell. Biochem.*, 49, 46, 1992.

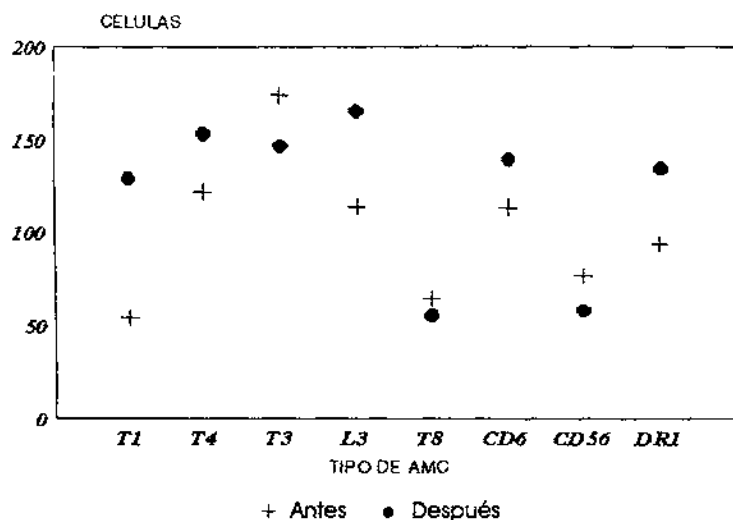


Fig. 7. Cantidad de células marcadas con AMC en la dermis correspondiente a pacientes psoriáticos tratados con Calcipotriol.

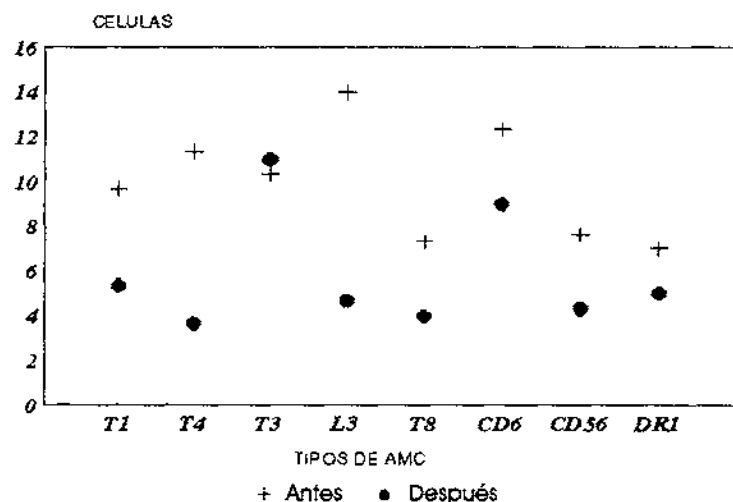


Fig. 8. Cantidad de células marcadas con AMC en la epidermis correspondiente a pacientes psoriáticos tratados con Calcipotriol.

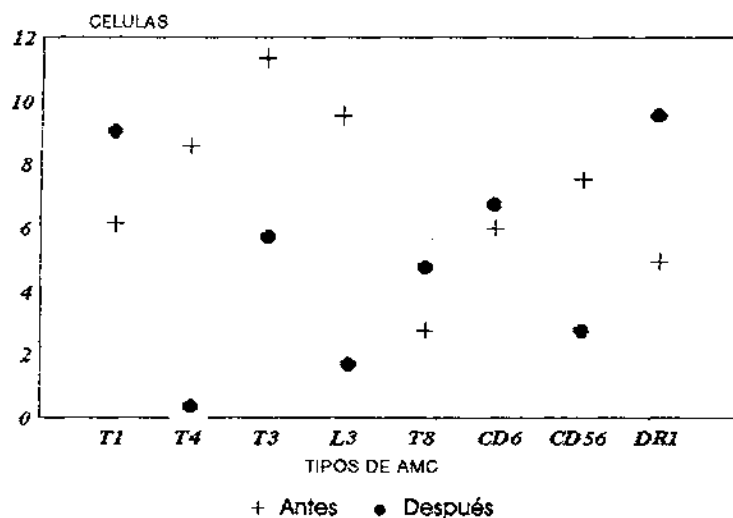


Fig. 9. Cantidad de células marcadas con AMC en la unión dermis-epidermis correspondiente a pacientes psoriáticos tratados con Calcipotriol.

Tabla 1. Cantidad de células marcadas con AMC correspondientes a pacientes psoriáticos tratados con AMC t_1 .

Caso	Antes					Después			
	1	11	12			1	11	12	
t_1	1	5	4	11	6,666 667	0	0	0	0
	2	57	69	117	81	4	42	66	37,333 33
	3	8	1	6	5	0	0	10	3,333 333
t_4	1	4	6	15	8,333 333	0	0	7	2,333 333
	2	150	57	184	130,333 3	13	31	65	36,333 33
	3	6	5	10	7	0	0	0	0
t_3	1	7	7	21	11,666 67	0	0	11	3,666 667
	2	207	98	102	135,666 7	110	36	117	87,666 66
	3	6	5	11	7,333 334	0	0	8	2,666 667
L_3	1	7	8	18	11	0	0	14	4,666 667
	2	193	172	170	178,333 3	62	92	179	111
	3	5	7	12	8	0	0	5	1,666 667
t_2	1	7	10	28	15	0	0	6	2
	2	37	49	70	52	22	54	68	48
	3	5	8	4	5,666 667	0	0	7	2,333 333
CD_5	1	9	12	38	19,666 67	0	0	4	1,333 333
	2	148	146	197	163,666 7	23	23	154	66,666 66
	3	6	7	19	10,666 67	0	0	7	2,333 333
CD_{56}	1	7	0	11	6	4	0	6	3,333 333
	2	189	52	127	122,666 7	71	28	62	53,666 67
	3	7	0	8	5	0	0	3	1
DR_1	1	5	16	27	16	4	0	0	1,333 333
	2	114	109	136	119,666 7	57	39	127	74,333 34
	3	5	10	18	11	1	0	17	6

1. Epidermis. 2. Dermis. 3. Unión dermis-epidermis.

Tabla 2. Cantidad de células marcadas con AMC correspondientes a pacientes psoriáticos tratados con Calcipotriol.

		Antes				Después			
Caso		1	11	12		1	11	12	
t_1	1	3	22	4	9,666 667	16	0	0	5,333 334
	2	72	65	25	54	189	189	9	129
	3	2	15	2	6,333 334	17	10	0	9
t_2	1	11	14	9	11,333 33	4	7	0	3,666 667
	2	177	97	92	122	231	181	48	153,333 3
	3	7	14	4	8,333 333	1	0	0	0,333 333
t_3	1	10	12	9	10,333 33	22	11	0	11
	2	180	242	99	173,666 7	181	206	53	146,666 7
	3	10	15	9	11,333 33	9	8	0	5,666 667
L_3	1	16	18	8	14	0	14	0	4,666 667
	2	90	135	97	114	239	179	78	165,333 3
	3	14	13	2	9,666 667	0	5	0	1,666 667
t_4	1	14	5	3	7,333 334	6	6	0	4
	2	84	82	26	64	68	68	30	55,333 333
	3	1	6	2	3	7	7	0	4,666 667
CD_6	1	12	19	6	12,333 33	23	4	0	9
	2	95	166	79	113,333 3	211	154	53	139,333 3
	3	3	10	6	6,333 334	14	7	0	7
CD_{56}	1	4	8	11	7,666 667	7	6	0	4,333 334
	2	71	33	127	77	56	62	57	58,333 333
	3	4	11	8	7,666 667	5	3	0	2,666 667
DR_1	1	7	6	8	7	11	0	4	5
	2	149	41	91	93,666 66	92	247	64	134,333 3
	3	9	3	2	4,666 667	7	17	5	9,666 667

1. Epidermis. 2. Dermis. 3. Unión dermis-epidermis.

INTERNATIONAL CLINIC of OZONE THERAPY

for the care and improvement of your health.

PERSONALIZED TREATMENTS.

HIGH QUALIFIED PROFESSIONALS.

MODERN TECHNICAL EQUIPMENT.

MODERN PROCEDURES.

Your treatment in the Clinic is a product of a serious and intensive work performed by the OZONE RESEARCH CENTER OF CUBA and supported internationally by its high rigor and outstanding participation of specialists in scientific meetings about this subject.

Biological effects of ozone therapy in the human being:

- ☐ *Improvement in the oxygen metabolism.*
- ☐ *Modulation of the biological oxidative stress and of the immune system.*
- ☐ *Germicide power of broad spectrum.*

These effects confer ozone, therapeutical properties that allow its application in a great number of medical specialties and diseases of different etiologies among them:

Internal Medicine: ischemic cerebrovascular disease, immunity disturbances, hypercholesterolemia, sickle-cell anemia.

Cardiology: ischemic cardiopathy.

Geriatrics: senile dementia.

Angiology: circulatory insufficiency, diabetic foot, ulcers of the lower limbs.

Orthopedics: rheumatoid arthritis, osteoarthritis and local treatment of septic process (fistula, bedsores, osteomyelitis).

Ophthalmology: glaucoma of open angle, optic neuropathy, retinitis pigmentosa.

Otorhinolaryngology: cochleovestibular syndrome.

In other affections related to degenerative biological process, in the third age or in chronic diseases, ozone therapy contributes to increase the quality of life of the patients. Up to now there is no evidence of side effects in its application.

Please contact us for more details:



INTERNATIONAL CLINIC OF OZONE THERAPY

! 5th Avenue and 230 Street, Siooney, P.O. Box 6880, Havana, Zip Code 10600, Cuba.

Telephones: (537) 2.-9264, 21-2089. Fax: (537) 21-0233, 33-0497.

E-mail: ozono@informed.sld.cu <http://www.ozono.cuaweb.cu>