



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Activación diferencial de células mononucleares de
sangre periférica de sujetos sanos y psoriasicos expuestas
a matriz extracelular”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA :

ISMAEL MANCILLA HERRERA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Constantino III Roberto López Macías

VOCAL: Profesor: Laura Cecilia Bonifaz Alfonso

SECRETARIO: Profesor: Lourdes Andrea Arriaga Pizano

1er. SUPLENTE: Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarria

2° SUPLENTE: Profesor: Araceli Mendieta Rergis

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

ASESOR DEL TEMA: Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): Ismael Mancilla Herrera

(nombre (s) y firma (s))

DEDICATORIAS

A mis padres Socorro y Francisco por apoyarme en todo momento.

A mis hermanos que soportaron tantos días de ausencia y falta de atención.

A mi amiga, tutora y maestra Lulú que me aguantó y apoyó en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Isibasi por brindarme la gran oportunidad de pertenecer al grupo de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, gracias a lo cual cada día soy mejor académica y personalmente.

Al Dr. Constantino López por todo el apoyo académico (y financiero) y ser prácticamente la vía por la que llegue a la ciencia.

A la Dra. Laura Bonifaz, por el tiempo y disposición que ha dedicado en mi desarrollo.

Al Dr. Fermín Jurado, la Dra. Regina Malo y al Dr. Erick Aceves, expertos dermatólogos, por su experiencia y esfuerzo indispensable para la realización de este proyecto.

Al Dr. Eduardo Pérez Salazar por permitir el integrarme a su grupo de trabajo para poder realizar buena parte de este trabajo.

A la cDra. Adriana Soto quien fue mi asesora técnica y amiga.

A Javier Arturo, Marcela, Jacqueline, Isabel, Mireille, Itzmel y Elí, mis compañeros de la UMIQ por crecer junto a ello, por apoyarme y por aguantarme.

A la Cynthia Paola, Cynthia María, Sitlali, Mariana y Eduardo por haberme acompañado durante toda la carrera y apoyarme en las buenas y en las malas.

A Laura por haber estado conmigo durante tanto tiempo ayudándome a tomar decisiones y a aceptar las cosas como son.

Y especialmente a la Dra. Lourdes A. Arriaga Pizano por su apoyo, su comprensión, su cariño, su instrucción y su amistad.

ABREVIATURAS

CSMP	Células mononucleares de sangre periférica
CAM	Moléculas de adhesión celular
ColIV	Colágena tipo IV
ERK ½	Cinasa reguladora de señales extracelulares, isoformas 1 y 2
HEV	Endotelio vascular alto
HLA	Antígeno leucocitario humano
IL	Interleucina
INF	Interferón T
LPS	Lipopilisacárido
MAPK	Proteín-cinasas activadas por mitógenos
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
NF	Factor nuclear
P-ERK	Phospho-p44/42, Thr202/Tyr204, ERK
pLL	poli-L-lisina
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
JNK	Cinasa N-terminal c-Jun

ABREVIATURAS

CSMP	Células mononucleares de sangre periférica
CAM	Moléculas de adhesión celular
ColIV	Colágena tipo IV
ERK ½	Cinasa reguladora de señales extracelulares, isoformas 1 y 2
HEV	Endotelio vascular alto
HLA	Antígeno leucocitario humano
IL	Interleucina
INF	Interferón T
LPS	Lipolisacárido
MAPK	Proteín-cinasas activadas por mitógenos
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
NF	Factor nuclear
P-ERK	Phospho-p44/42, Thr202/Tyr204, ERK
pLL	poli-L-lisina
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
JNK	Cinasa N-terminal c-Jun

INDICE.

RESUMEN.	2
ANTECEDENTES.	3
Psoriasis.	3
Composición de la piel normal.	4
Placas psoriásicas	6
Citocinas y piel	8
Factor de necrosis tumoral - α (TNF-α)	9
Familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)	10
Cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs)	11
Infiltrado de células mononucleares al epitelio	12
Integrinas	13
Matriz extracelular (MEC).	16
Colágena.	17
Implicaciones de la activación celular por componentes de la MEC.	19
Metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP)	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
JUSTIFICACION	22
HIPOTESIS	22
OBJETIVOS.	23
GENERAL:	23
ESPECIFICOS:	23
MATERIAL Y METODOS	24
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	27
RESULTADOS.	35
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	40
CONCLUSIÓN	44
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45

RESUMEN.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria de evolución crónica que se manifiesta por lesiones en piel y articulaciones. Las lesiones se generan por del crecimiento exacerbado de los queratinocitos (hiperqueratosis), el cual es favorecido por la presencia de moléculas proinflamatorias, del tipo factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interferón- γ (IFN- γ), Interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-8, que *in vitro* se sabe constituyen factores de crecimiento para los queratinocitos. Estos factores quimiotácticos inducen la migración desde los vasos sanguíneos hacia la dermis y epidermis de linfocitos y neutrófilos, que interaccionan así con moléculas de matriz extracelular (MEC) al expresar moléculas tipo integrinas. En sujetos con psoriasis se ha encontrado una mayor expresión de las integrinas α 1 β 1, que unen colágena IV y laminina y pueden así activar diferentes vías de comunicación intracelular incluyendo la del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y la de proteínas-cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Cabe señalar que estas dos vías resultan primordiales en el desarrollo de los procesos inflamatorios al inducir la producción de citocinas como IL-1 β y TNF- β en macrófagos. Es entonces factible que el reconocimiento de componentes de la MEC favorezca en la psoriasis, el proceso inflamatorio asociado a las lesiones. Por tal, nos propusimos explorar si las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas de sujetos con psoriasis y sujetos sanos, se activan diferencialmente ante un estímulo inflamatorio después de haber estado o no en contacto con colágena tipo IV *in vitro*,

Observamos que las CMSP de sujetos con psoriasis secretan mayor cantidad de TNF- α que las células de sujetos sanos e interesantemente, que la exposición a colágena tipo IV disminuye esta respuesta aún con el estímulo inflamatorio. Esta disminución en la capacidad de activación por LPS se evidenció también por la menor expresión de P-ERK $\frac{1}{2}$ después de que las células se expusieron a colágena, pero dado que no encontramos diferencias en la expresión de esta MAP cinasa en su forma fosforilada, entre los grupos de sujetos estudiados, otras deben ser las vías de transducción implicadas en la respuesta proinflamatoria de las CMSP de sujetos psoriásico.

ANTECEDENTES.

Psoriasis.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria sistémica de evolución crónica persistente que se manifiesta en la piel y articulaciones. Afecta al 2% de la población caucásica³ y aunque no es mortal, tiene un impacto importante sobre la calidad de vida de los pacientes, similar al que tienen enfermedades como la depresión, diabetes mellitus, artritis reumatoide, hipertensión, insuficiencia cardiaca congestiva o el cáncer⁴. La psoriasis se desarrolla frecuentemente en individuos de entre 15 y 30 años de edad, aunque personas de todas las edades pueden ser afectadas⁵. Se caracteriza por la presencia de lesiones eritematosas cubiertas por escamas grisáceas, donde existe un engrosamiento de la capa córnea y desaparición de la capa granulosa de la piel (paraqueratosis). Dichas lesiones se deben a la proliferación anormal de queratinocitos (hiperqueratosis) y los análisis histopatológicos muestran un importante infiltrado en dermis y epidermis de células inflamatorias como neutrófilos, macrófagos y linfocitos T activados. Desafortunadamente, hasta el momento se desconoce la causa o causas que inician este proceso inflamatorio asociado a la hiperqueratosis, lo cual hace que el manejo de la enfermedad sea meramente sintomático y de control¹.

La relación que existe entre contar con antecedentes familiares de psoriasis y un inicio temprano y/o una evolución más grave, apoyan la existencia de un componente genético en la etiología de la psoriasis⁶. Se ha propuesto que esta compleja enfermedad tiene una base multigénica, habiéndose identificado hasta el momento 1,300 genes que pudieran relacionarse con el desarrollo de las lesiones^{5,7}. *PSORS1* es uno de estos genes de susceptibilidad para la psoriasis. Este gen se encuentra localizado cerca de la región del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) en el cromosoma 6 humano⁸. Al menos se ha relacionado a otros 9 genes con el desarrollo de psoriasis, entre los que se encuentran *PSORS2*(17q25), *PSORS3* (4q34) y *PSORS4*(1q21)^{9,10}, los cuales se propone pudieran actuar de forma aditiva o sinérgica con *PSORS1*, aunque se desconocen los mecanismos. Otros genes estudiados de forma reciente son el gen *PSORS5* y

ZNF313/RNF114¹¹, y se propone que todos los factores desencadenantes o “disparadores” de la psoriasis, como el estrés mecánico, las infecciones y los fármacos pueden activar a estos y otros genes, como los proinflamatorios^{1,12,13}.

Ahora bien, la psoriasis vulgar, también llamada psoriasis en placas, es la forma clínica más frecuente de presentación de la psoriasis (80 -90%)¹⁴. Se caracteriza por placas eritematosas de borde neto, descamativas y generalmente asintomáticas. Su distribución suele ser simétrica, predominando en la cara extensora de las articulaciones, principalmente codos y rodillas (zonas de reconocido estrés mecánico). También suele ubicarse en la zona lumbar baja, en piel cabelluda y zona periumbilical, así como otros sitios sometidos a trauma o presión, aunque por lo general respeta pliegues cutáneos y cara¹⁵.

Composición de la piel normal.

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, compuesto por múltiples capas de tejido epitelial. Tres son las capas fundamentales: Epidermis, Dermis, y Tejido Subcutáneo.

La epidermis se compone en su mayoría por queratinocitos (cuya forma madura se concentra en el estrato córneo) y melanocitos, (responsables de la pigmentación de la piel y que se encuentran justamente sobre el estrato germinativo). En cortes histológicos de piel se pueden apreciar a células de Langerhans y linfocitos residentes distribuidos entre los otros componentes de la epidermis. Esta epidermis se subdivide en estrato córneo, granuloso, espinoso y membrana basal. Normalmente los queratinocitos maduran desde el estrato basal hacia el estrato más superficial, el córneo, donde se encuentran como células sin núcleo y ricas en queratina (llamados corneocitos)¹.

La dermis es una capa más profunda de la piel la cual tiene como peculiaridad la abundancia de las fibras de colágeno y elastina, que se disponen paralelamente y que le dan a la piel la consistencia y elasticidad característica del órgano. Histológicamente la dermis se subdivide en 2 capas: el estrato papilar, compuesto por tejido conectivo laxo, fibras de colágeno tipo III y capilares; el estrato reticular, compuesto por tejido conectivo denso, fibras

de colágeno tipo I y fibras elásticas entre las que se distribuyen mastocitos, reticulocitos y macrófagos. En su porción inferior se observa una capa de músculo liso que conforma al músculo piloerector. En la piel facial existe musculatura de tipo estriado en donde hay fijación de los músculos de la mímica en la dermis.

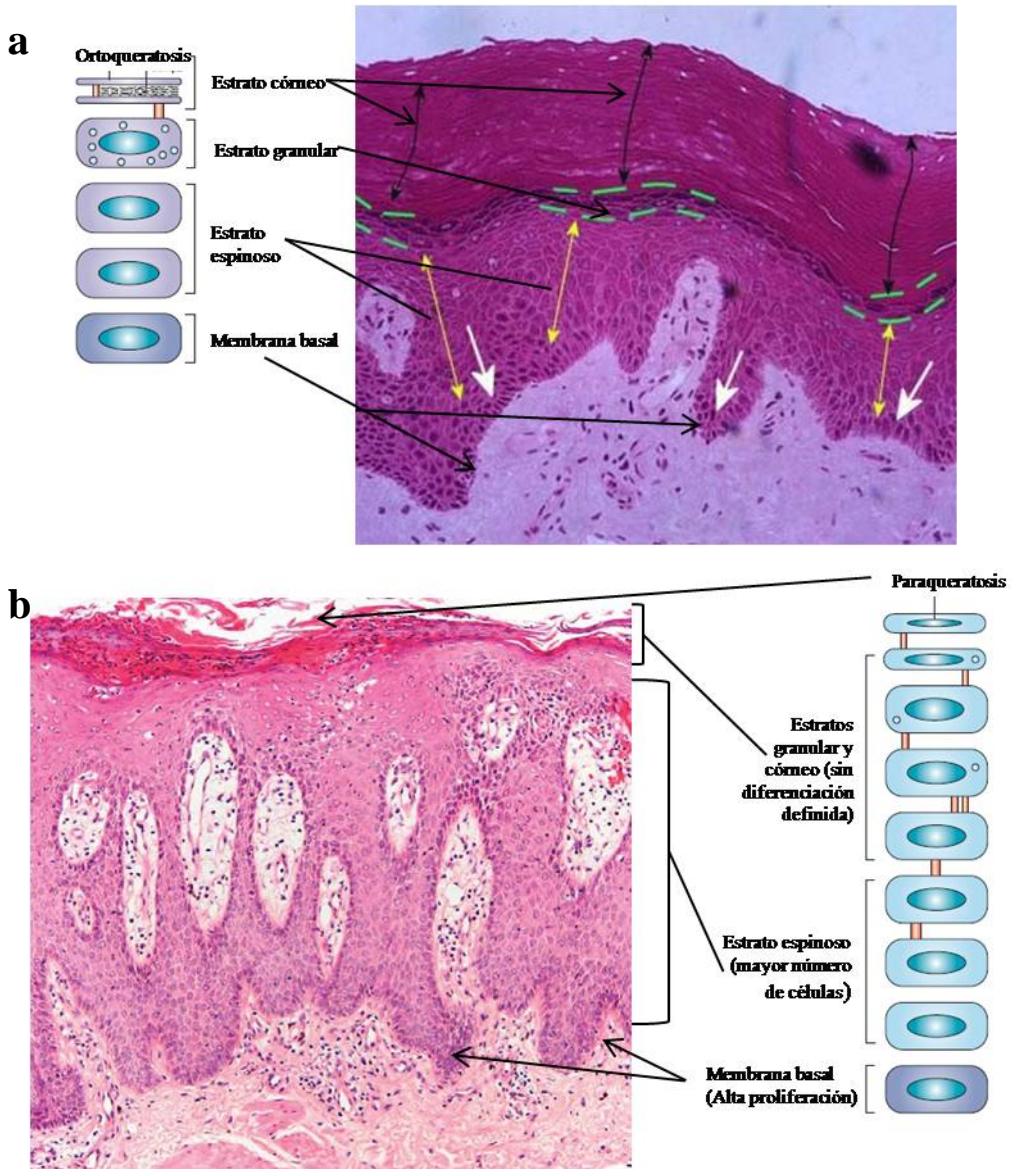


Figura 1 Diferencias entre los estratos dérmicos de piel sana y piel psoriásica
En los cortes histológicos de piel que se muestran, se observan las diferencias entre una piel sana (a) y una piel afectada con psoriasis (b). En esta última claramente se observa el engrosamiento del estrato espinoso y granular, así como la presencia de queratinocitos con núcleo en el estrato córneo (paraqueratosis)¹.

Finalmente, el tejido subcutáneo es un estrato de la piel que compuesto por tejido conjuntivo laxo, adipocitos, ligamentos y nervios cutáneos y donde se insertan vasos sanguíneos y linfáticos. Este estrato es el responsable de la capacidad termoreguladora de piel, así como de la flexibilidad de la misma que permite se deforme sin romperse al realizar diferentes movimientos corporales^{16,17}.

Placas psoriásicas

La hiperplasia de los queratinocitos epidérmicos genera la hipertrofia del estrato epidérmico en la psoriasis. Este fenómeno incluye al engrosamiento de la capa granulosa de la epidermis que se fusiona con el estrato córneo y da lugar a la generación de paraqueratosis (formación incompleta de la capa córnea con la retención del núcleo en los queratinocitos)^{2,18,19}(Figura 1b). Lo anterior se asemeja a los cambios propios de la “maduración regenerativa”, propia de la reparación de tejidos desencadenada por heridas, solo que en la psoriasis la diferenciación de los queratinocitos ocurre de forma acelerada sin lograr llegar a la etapa terminal de corneocitos o queratinocitos maduros que son los que normalmente se ubican en el estrato córneo^{6,7}. Por otra parte, el recambio de queratinocitos en piel normal es aproximadamente del 60% y ocurre en 311 horas, mientras que en la piel de las personas con psoriasis el recambio es del 100% y ocurre en solo 36 horas¹⁸. Asociado a lo anterior esta la disminución en la tasa de apoptosis de los queratinocitos de personas con psoriasis, además de presencia de citocinas proinflamatorias, que pueden constituir factores de crecimiento para los queratinocitos, lo cual puede desencadenar y/o perpetuar las de lesiones psoriásicas^{6,20-23}.

Se propone entonces que para la generación de las lesiones psoriásicas se requiere al menos de la interacción de dos tipos de células: los queratinocitos epidérmicos y los leucocitos, que incluyen a macrófagos y linfocitos T, y neutrófilos²⁴. Los linfocitos son tanto residentes de piel como células infiltrantes para lo cuál requieren de la expresión de moléculas tipo CAM (moléculas de adhesión celular), como son el antígeno leucocitario cutáneo (CLA) o la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) en la superficie

de los linfocitos T. También se requiere que se incremente la expresión de factores de adhesión por las células del epitelio vascular, tales como selectinas P (selectinas de plaquetas) y E (selectinas de endotelio). La expresión de varias de estas moléculas, además se asocia con enfermedades inflamatorias de la piel dermatitis atópica, linfoma cutáneo de linfocitos T y psoriasis^{20,25}.

En comparación con células de personas sanas, las células T encontradas en la dermis de sujetos con psoriasis, expresan mayores signos de activación, tales como la expresión moléculas del MHC (tal como HLA-DR) y CD25 (que corresponde al receptor de baja afinidad para IL-2)^{26,27}.

Una de las hipótesis más aceptadas acerca de la generación de las placas psoriásicas (esquemática en la figura 2) propone que los queratinocitos activados por los factores disparadores (infecciones, insultos mecánicos o químicos) o bien, las células inmunológicas de piel activadas por el reconocimiento de un antígeno dérmico aún no identificado²⁸, liberan factores solubles para el reclutamiento de células inmunológicas circulantes hacia piel. Estos linfocitos circulantes, que se pueden encontrar “preactivados”, migran hacia la piel desde la circulación periférica^{29,30}, para lo cual requieren de la expresión de selectinas y moléculas de adhesión vascular 1 (VCAM-1) por las células endoteliales, que favorece el “rodamiento” (“rolling”) y diapédesis de estas células mononucleares circulantes hacia la piel. Durante estos procesos, las CMSPs entran en contacto con la matriz extracelular (MEC). La interacción celular con los diferentes componentes de la MEC activa la producción de metaloproteinasas (que degradan colágena) y provoca modificaciones de citoesqueleto necesarias para la migración³¹.

Ahora bien, una vez que han llegado a la dermis o epidermis, es factible que los linfocitos T estimulen a los queratinocitos mediante la secreción de citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1 β , mismas que tienen la capacidad de aumentar la proliferación de queratinocitos *in vitro*²⁰, mientras que *in vivo* se sabe que favorecen la angiogénesis en piel, incrementan la producción de componentes de la MEC, como colágena, y favorecen el reclutamiento de células del sistema inmune hacia piel⁹. Adicionalmente, estas

citocinas inducen su producción por otras células, como son queratinocitos, células dendríticas y macrófagos aumentando así la inflamación local³². El fenómeno inflamatorio se puede perpetuar por el daño subletal que producen los linfocitos T citotóxicos en los queratinocitos^{30,32}.

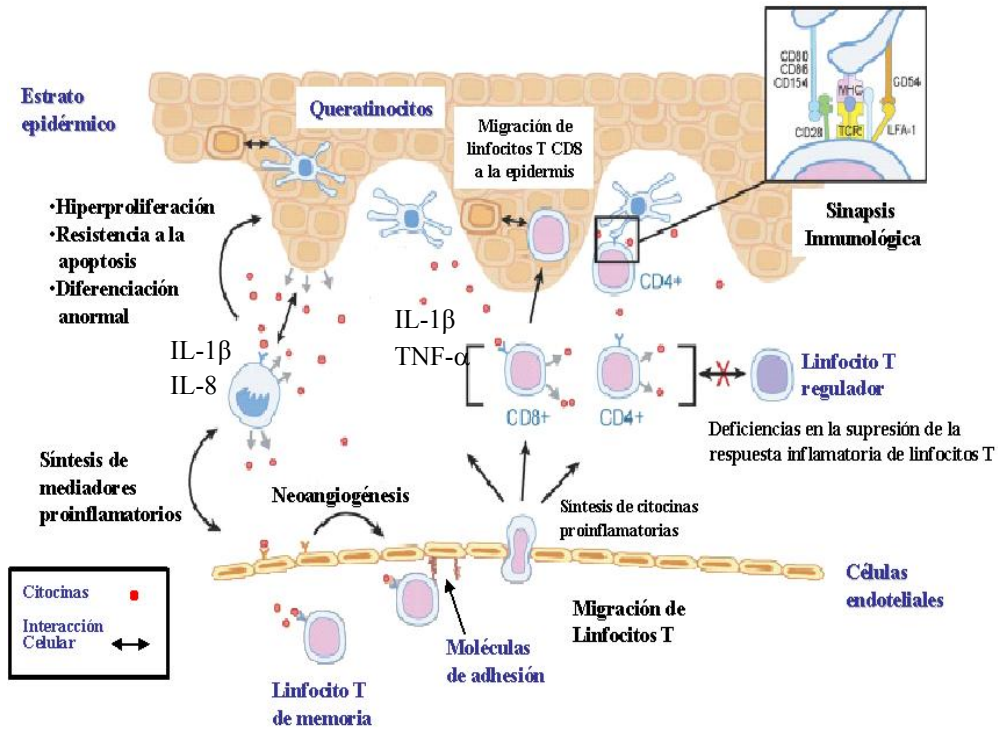


Figura 2. Modelo propuesto de la participación del proceso inflamatorio en la psoriasis. El mantenimiento del ambiente proinflamatorio en las lesiones psoriásicas depende de la activación de los linfocitos (CD4+ y CD8+) por las células presentadoras de antígeno en la piel, lo que favorece la proliferación de los linfocitos T, así como la producción crónica de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-8, TNF- α , IFN- γ) que se mantienen en este proceso manera crónica. Estas citocinas favorecen la proliferación exacerbada y acelerada de queratinocitos. La hiperproliferación apoyada por la angiogénesis se suma con la disminución en la apoptosis de los queratinocitos, generándose la placa psoriásica².

Citocinas y piel

La exposición de TNF- α en queratinocitos genera cambios en la expresión génica para la remodelación del citoesqueleto y la MEC, la migración, la proliferación y la diferenciación, así como en el incremento y mantenimiento del proceso inflamatorio³³. Además, se sabe que IL-3 e IL-6 promueven la proliferación de queratinocitos *in vitro*, mientras que IL-8 actúa como quimioquina reclutando linfocitos T y macrófagos; la IL-5 junto con la IL-3 promueve la expansión y activación de mastocitos; el IFN- γ , TNF- β y el TNF- α

activan a los macrófagos que incrementan, entre otras, su actividad microbicida^{7,13,20}. Entonces, la actividad de estas citocinas es primordial para el mantenimiento de la inflamación no solo por su actividad sobre células del sistema inmune, sino también al actuar sobre los queratinocitos, ya que estos últimos son capaces de producir IL-1 β , IL-6 y TNF- α , para inducir, por ejemplo, el reclutamiento de neutrófilos y linfocitos T mediante la secreción de IL-8⁹. A estos procesos proinflamatorios exacerbados se pueden sumar la disminución de citocinas como IL-10, IL-4 o factor de crecimiento transformante (TGF)- β , que al ser administrados subcutáneamente en modelos de ratones reducen estos efectos inflamatorios²⁰.

Ya que muchos de los cambios fenotípicos y patológicos de la psoriasis están relacionados con las citocinas secretadas por células T, células dendríticas, monocitos y queratinocitos locales, se han propuesto diversos tratamientos encaminados a la neutralización de estas citocinas proinflamatorias³⁰. De hecho, ya se utilizan inhibidores de TNF- α como tratamiento de las formas más graves de psoriasis, que si bien muestran importante mejoría clínica, sus efectos adversos incluyen el resurgimiento de enfermedades como la tuberculosis^{34,35}.

Factor de necrosis tumoral - α (TNF- α)

El TNF- α , también conocido como caquectina, es una citocina proinflamatoria que actúa como mediador en la defensa del hospedero contra infecciones y neoplasias. Se produce principalmente por macrófagos, pero también puede ser expresada por linfocitos T activados, células cebadas, queratinocitos y dendrocitos dérmicos^{36,37}. Su expresión es importantemente controlada por elementos promotores, como el factor nuclear- κ B (NF- κ B) y la proteína activadora -1 (AP-1), que actúan en conjunto con la RNA polimerasa II que media la transcripción, aunque su secreción es controlada tanto traduccional como postraduccionalmente^{38,39}.

La liberación de TNF- α produce la activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, liberación

de inmunoglobulinas y activación de complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B^{40,41}. Otros efectos incluyen la activación e incremento de la adhesión plaquetaria.

Estas funciones del TNF requieren la unión con su receptor, mismo que se asocia al reconocer a su ligando, formando heterodímeros. Los dos diferentes tipos del receptor para TNF alfa se localizan en células como neutrófilos, endotelios y fibroblastos. Existe también una forma soluble de los receptores que se han podido detectar en suero y en líquido sinovial. Aunque localmente puede ser que los efectos del TNF- α sean favorables a la economía, los efectos sistémicos de la citocina pueden incluir síndromes tan graves como el choque séptico ó la coagulación intravascular diseminada⁴¹⁻⁴³.

La exposición de las células a componentes bacterianos como el lipopolisacárido (LPS) activa diversas vías de señalización, incluyendo NF- κ B, fosfatidilinositol 3-cinasa, y proteína cinasa C⁴⁴, pero también puede activar, diversas vías de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), como la cinasa reguladora de señales extracelulares (ERK), la cinasa N-terminal c-Jun (JNK), y la proteína activada por mitógenos p38⁴⁴⁻⁴⁹. La producción de TNF- α depende en gran medida de la vía de señalización de las MAPK, ya que la inhibición selectiva de las vía de señalización de p38 y ERK inhibe la producción de TNF- α inducida por LPS^{50,51}, y también ha sido reportado que la cinasa JNK es requerida para la traducción del mRNA después de la inducción por LPS⁵².

A pesar de los beneficios en la regulación del sistema inmune, el TNF- α está implicado en la patogénesis tanto de enfermedades inflamatorias agudas como crónicas, tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y psoriasis⁵³.

Familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)

La respuesta de las células a estímulos extracelulares es en gran parte mediada por diversas enzimas cinasas y fosfatasas intracelulares. Una de las principales familias que realiza estas funciones son las proteínas cinasas

activadas por mitógenos (MAPK), que son miembros de cascadas de señalización, las cuales son activadas por diversos estímulos extracelulares, y regulan así diferentes procesos celulares⁴⁹. Esta familia de las MAPKs, incluye a las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), a la proteína-cinasa N-terminal c-Jun, así como a aquellas activadas por estrés (JNK/SAPK), MAPK ERK/big 1 (BMK1) y a las proteínas-cinasas del grupo p38⁵⁴. Las cinasas pertenecientes al grupo ERK, han sido caracterizadas como unos de los componentes de las vías de transducción de señales relacionadas a estímulos de crecimiento⁵⁴. El grupo de JNK es activado en respuesta al estrés celular como son los estados de alta osmolaridad y oxidación⁵⁵. El grupo de las BMK1 regulan las vías de señalización relacionados con expresión de genes tempranos inducidos por suero⁵⁶. El grupo de las cinasas p38 han sido involucradas en la inflamación, crecimiento, diferenciación y muerte celular⁵⁷.

Cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs)

El reconocimiento de factores de crecimiento por receptores tirosina-cinasas, recluta una amplia red de proteínas involucradas en la señalización intracelular. Una de las vías más importantes que componen estas redes es la cascada de la vía de señalización ERK, de la que se han descrito dos isoformas: ERK 1 y ERK 2, que son funcionalmente homólogas, por lo que se les refiere comúnmente ERK 1/2⁵⁸.

ERK 1 y ERK 2 son serina-treonina (Ser/Thr) cinasas de 44- y 42-kDa de peso molecular respectivamente, expresadas en casi todos los tejidos animales, encontrándose, generalmente mayores niveles de ERK 2 que de ERK 1. La fosforilación en ambos residuos de Thr y Tyr es requerida para la activación de las dos isoformas de ERK, Thr202/Tyr204 para ERK 1 y Thr185/Tyr187 para ERK 2⁵⁹. Estas enzimas tienen la capacidad de activar diferencialmente a las células, dependiendo de la estirpe celular a la que pertenezcan. Su papel en el proceso inflamatorio es de gran relevancia ya que la inhibición de estas cinasas en macrófagos resulta en la disminución de la expresión de TNF- α e IL-1 β ⁶⁰.

Infiltrado de células mononucleares al epitelio

Durante el proceso inflamatorio agudo o crónico, inicialmente los macrófagos tisulares secretan citocinas que favorecen la inflamación, como son IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Estas citocinas, cuentan con actividades redundantes y efectos pleiotrópicos, que incluyen la inducción de fiebre por vía hipotalámica, la síntesis de proteínas de fase aguda por el hígado, el aumento de la permeabilidad vascular, el aumento de las moléculas de adherencia sobre el endotelio vascular como la E-selectina e ICAM-1, la proliferación de fibroblastos, la inducción de quimiocinas, la activación de células T y B, entre otras.

En el transcurso de un proceso inflamatorio local, una serie de citocinas y quimiocinas son secretadas por las células epiteliales y las células presentadoras de antígeno que se encuentran en el tejido. Estas citocinas difunden hacia los vasos sanguíneos y linfáticos, generando una respuesta en las células endoteliales vasculares, que a su vez expresarán en su membrana moléculas tipo CAM específicas de leucocitos que junto con las sustancias quimioatrayentes que difunden hacia el torrente circulatorio, favorecen la adhesión de los leucocitos circulantes a la pared endotelial como primer paso para la migración hacia los tejidos⁶¹. La adherencia inicial depende, también de la presencia de selectinas, proteínas que forman un pequeño grupo de tres glucoproteínas L, E y P, que poseen un dominio tipo lectina y a menudo se encuentran enlazadas con moléculas similares a la mucina (cuyos ligandos son carbohidratos sialilados), median el proceso de “rodamiento” de leucocitos sobre las células endoteliales al reconocer a sialoglicoproteínas fucosiladas sobre las células endoteliales⁶¹⁻⁶³. Durante el rodamiento, los leucocitos pueden además encontrar en la superficie de células de las vénulas con endotelios altos (HEV), señales quimioatrayentes que inducirán la expresión de integrinas en su membrana, lo que aumenta la afinidad por los componentes de la MEC e induce arresto celular. Estas primeras integrinas reclutadas están ancladas al citoesqueleto, por lo que una vez que se han ligado a su sustrato específico, pueden desencadenar el rearrreglo del mismo y señalizar para el reclutamiento de más integrinas en una zona específica de la membrana, lo que determina la

polarización de la célula. En el borde frontal de la célula, se realizará el agrupamiento de una serie de CAMs y receptores de quimiocinas, que le permitirán censar el tejido para dirigir la migración hacia las uniones intercelulares de las células endoteliales^{61,62,64}. Una vez que el leucocito ha llegado a las uniones, las células endoteliales pierden la adhesión por las señales producidas por quimiocinas y CAMs, y el leucocito comienza el movimiento mediante ciclos repetitivos de formación de lamelipodios y filipodios, los cuales interactúan con las CAMs en las células endoteliales como CAM intercelulares (ICAM-1), ICAM-2 y CAM vasculares (VCAM-1) principalmente, generando nuevos puntos de adhesión vía integrinas en el frente de la célula, cuya expresión aumenta y disminuye conforme la célula va avanzando^{61,62,64}.

En resumen, diversas citocinas liberadas en la reacción inflamatoria local de piel, facilitan la adherencia (integrinas, selectinas y cadherinas mediante) de leucocitos a células endoteliales vasculares y así su migración a través de la pared vascular hacia los espacios tisulares donde tendrán que atravesar diversos componentes de la matriz extracelular de dermis y epidermis (MEC)^{61,65}.

Integrinas

Las integrinas son una gran familia de proteínas transmembranales heterodiméricas conformadas por una gran variedad de subunidades α y β , de las cuales, en el humano se han descrito 18 subunidades α y 8 subunidades β , que al dimerizarse dan lugar a 24 diferentes tipos de integrinas^{66,67}. Estos receptores transmembranales se encuentran enlazando a la MEC con el citoesqueleto celular para fortalecer la unión celular. Así como los componentes de la MEC influyen en la organización del citoesqueleto, los filamentos de actina influyen en el ensamblaje y la orientación de las fibras de fibronectina, determinando así, la orientación del mismo⁶⁸ y, a comparación con los receptores membranales para moléculas solubles de señalización, las integrinas se unen con baja afinidad a su sustrato correspondiente,

promoviendo así una unión reversible con las proteínas de MEC, indispensable para la migración celular y la remodelación de los tejidos^{66,69}.

Los diferentes tipos de integrinas que se enlistan en la tabla 1, cuentan con una especificidad de unión a sustrato, modificable por factores adicionales dependiendo del tipo de células que las expresen. La unión a sustrato se realiza por dominios dependientes de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) localizados en la porción extracelular de las subunidades α y β . El tipo de catión utilizado puede influir en la afinidad y la especificidad de la integrina con su ligando^{6,66,67,69}.

Estos receptores transmembranales tienen, además de la adhesión, otro papel muy importante en la transducción de señales. Las integrinas en particular se encuentran involucradas en varias vías de fosforilación de proteínas y la generación diversos segundos mensajeros citoplasmáticos⁶⁶.

Cabe mencionar que la inhibición de la integrina $\alpha 1\beta 1$, un receptor para colágena presente en células T epidérmicas con fenotipos de memoria efectora, puede inhibir la aparición de las lesiones psoriásicas²¹, evidenciando así la participación de los componentes de la matriz extracelular en la patogénesis de la enfermedad.

Tabla 1. Características de Integrinas

Integrin	Nombres alternativos	Ligandos	Distribución celular
$\alpha_{IIb} \beta_3$	Glicoproteína IIb y IIIa (CD41/CD61), Molécula de adhesión de macrófagos (CD11b/CD18)	Fibrinógeno soluble, fibronectina y vitronectina	Plaquetas, endotelio
$\alpha_M \beta_2$	Antígeno asociado a la función linfocitaria 1 (CD11a/CD18)	C3bi, factor X de coagulación, fibrinógeno e ICAM-1	Monocitos, granulocitos, linfocitos granulares.
$\alpha_L \beta_2$	Antígeno asociado a la función linfocitaria 1 (CD11a/CD18)	Contrarreceptores de la superfamilia de las Inmunoglobulinas e ICAM-1	Todos los leucocitos
$\alpha_X \beta_2$	p150, 95 (CD11c/CD18)	Fibrinógeno	Monocitos, granulocitos linfocitos granulares, plaquetas y algunos linfocitos B
$\alpha_D \beta_2$	(CD11c/CD18)	VCAM-1	Linfocitos B
$\alpha_4 \beta_7$	Molécula 1 de adhesión de linfocito a placa de Peyer	VCAM-1 y fibronectina	Algunos linfocitos T de memoria, eosinófilos, basófilos, endotelio
$\alpha_4 \beta_1$	antígeno tardío 4 VLA-4 (CD49/CD29)	Fibronectina y VCAM-1	Linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, NK
$\alpha_1 \beta_1$	VLA-1 (CD49a/CD29)	Colágenas tipo I y IV y laminina	Linfocitos T activados, fibroblastos sinusoides hepáticos, mesangio
$\alpha_V \beta_3$	(CD51/CD61)	Fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, trombospondina, osteopontina y factor de Von Willebrand	Endotelio, plaquetas, células mesenquimales
$\alpha_5 \beta_1$	(CD49e/CD29)	Fibronectina	Linfocitos monocitos

Matriz extracelular (MEC).

En los tejidos, además de las células, una gran parte del volumen lo constituye el espacio extracelular, el cual está ocupado, principalmente, por la llamada matriz extracelular (MEC)⁶⁹. Existe gran diversidad en cuanto a los componentes y la forma en que estos se expresan en los diferentes tejidos, lo que le da una gran versatilidad, adaptándose a los requerimientos específicos de cada tejido. Tal es el caso de los huesos y dientes, en donde la MEC se calcifica para conferirles rigidez; en la córnea, la disposición altamente ordenada de las finas fibras que la componen forma una estructura transparente; en los tendones, se forman cordones que dan resistencia a la tensión; mientras que en la interfase entre el epitelio y el tejido conectivo forman la lámina basal⁶⁹, la cual es una fina capa de matriz extracelular que separa a las células epiteliales, miocitos o aún adipocitos del tejido conjuntivo.

La MEC es una estructura macromolecular de disposición radicular que se compone de una gran variedad de proteínas, proteogluocanos y polisacáridos, que provee un “armazón” para la adhesión celular y constituye así un soporte que brinda fortaleza y orden, a los tejidos³¹. Respecto a este último punto, es bien sabido que las células cuentan con desarrollados mecanismos de comunicación con otras células y con la MEC⁷⁰, misma que resulta fundamental para regular el comportamiento celular. Estas vías de comunicación entre las células y la MEC, puede influenciar directamente la supervivencia, desarrollo, migración, proliferación, morfología y distribución de las células⁷¹⁻⁷³.

A fin de mantener eficientemente su función, la composición de la MEC debe de modificarse constantemente, restituyendo sus componentes y manteniendo así la homeostasis tisular. Existen entonces mecanismos proteolíticos específicos que mantienen en equilibrio dinámico los sistemas de sobrevida, desarrollo, migración, proliferación, forma y distribución de las células⁷².

Los principales componentes proteicos de la MEC corresponden a la familia de colágenas, laminina, fibronectina, y glicoproteínas, destacando la familia de la colágena por ser estas las proteínas más abundantes de la MEC³¹.

Colágena.

De las proteínas que componen la MEC, las colágenas son el componente más abundante, extenso y complejo. Estas son, además, las proteínas más abundantes en mamíferos, constituyendo el 25% del total de su masa proteínica⁶⁹ y en la piel humana comprende más del 70% de su peso seco total¹⁴. Estas son proteínas sintetizadas, principalmente, por células del tejido conjuntivo⁶⁹, incluyen a las clásicas colágenas formadoras de fibras, a las colágenas amorfas que se encuentran en las membranas basales y a las colágenas transmembranales⁷⁴.

La biosíntesis de la colágena incluye diversos mecanismos que dependen de modificaciones postraduccionales enzimáticas, que aseguran la compleja estructura tridimensional. Hasta el momento se han descrito 33 genes que codifican para cadenas α de colágena. Una vez sintetizadas estas subunidades alfa, son transportadas desde el retículo endoplasmático rugoso al aparato de Golgi, donde sufren modificaciones postraduccionales antes de ser secretadas hacia el espacio extracelular. Una vez en el medio extracelular, los grandes dominios globulares de los extremos carboxi y amino terminal de estas procolágenas, son escindidos por proteasas específicas. De esta manera quedan expuestas las secuencias repetitivas gly-X-Y, indispensables para que las cadenas se enrollen una sobre otra⁷⁵. Es así como se dan las condiciones para la formación de largas estructuras helicoidales que pueden asociarse cabeza-cola para crecer longitudinal o lateralmente, lo que aumenta el grosor de las fibras, proceso denominado fibrogénesis⁷¹. La estabilización de estos polímeros depende, en buena medida, de la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina³¹, otra modificación postraduccionales indispensable para la funcionalidad de las colágenas.

Dependiendo del tipo de cadenas α trimerizadas, se reconocen aproximadamente veinte diferentes tipos de colágena, distribuidos diferencialmente en el organismo (Tabla 2)^{14,69}.

Tabla 2. *Tipos de colágena. Forma y distribución en el organismo*

Tipo	Fórmula molecular	Distribución
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Huesos, piel, tendones, ligamentos, córnea, órganos internos (90% del total de colágena en el cuerpo)
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Cartílago, discos intervertebrales, notocordio, humor vítreo del ojo
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Piel, vasos sanguíneos, órganos internos
IV	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$	Membrana basal de los tejidos. Tienen una distribución reticular en las membranas basales
V	$[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$	Huesos, piel, tendones, ligamentos, córnea, órganos internos. Se encuentra asociada a la colágena tipo I
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Debajo de el epitelio escamoso estratificado, Formando fibras de enlace
IX	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$	Cartílago. Se encuentra asociada lateralmente con la colágena tipo II
XI	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	Cartílago, discos intervertebrales, notocordio, humor vítreo del ojo. Se encuentra asociada con la colágena tipo II
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	Tendones, ligamentos, algunos otros tejidos. Se encuentra asociada lateralmente con la colágena tipo I
XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	Hemidesmosomas
XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	Lámina basal y alrededor de vasos sanguíneos

14,69

Las colágenas de tipo I, IV, V y XI están compuestas de dos o tres tipos de cadenas α ($[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$, $[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$, $[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$, y $\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$ respectivamente) y son los tipos de colágena más encontrados en el tejido conjuntivo. La colágena tipo I es la forma de distribución más amplia y mejor caracterizada. Se localiza principalmente en huesos y tendones y constituye aproximadamente el 80% del total de las colágenas de la dermis humana adulta.

La colágena tipo IV forma parte de las membranas basales del organismo. En la piel forma la unión dermo-epidérmica de la membrana basal, dentro de la lámina densa donde forma una red. Su composición heterotrimérica es: $[\alpha 1(\text{IV})]_2 \alpha 2(\text{IV})$, aunque podemos encontrarla en ocasiones como homopolímero ($[\alpha 1(\text{IV})]_3$ ó $[\alpha 2(\text{IV})]_3$). Esta molécula de colágena se diferencia de otras por la presencia de interrupciones de tipo no colágena dentro del dominio triple helicoidal, lo que confiere flexibilidad a la molécula^{68,76}.

Estructuralmente las colágenas se clasifican en: a) Colágenas fibrilares, b) Fibrillas de colágena, c) colágenas asociadas a fibrillas y d) colágenas formadoras de redes⁶⁹, las cuales se diferencian unas de otras por la interacción que estas tienen con otras moléculas.

Implicaciones de la activación celular por componentes de la MEC.

Como se mencionó anteriormente, las células T activadas, macrófagos y neutrófilos infiltrados en la dermis de psoriásicos migran a la piel desde la circulación periférica a dermis y epidermis³⁰. Pero para ello, las células entran en contacto con diversos componentes de la matriz extracelular (MEC), que se sabe pueden activarlas directamente o incluso, podrían modificar su capacidad de respuesta frente a otros estímulos.

Los componentes de la MEC, o fragmentos derivados de esta durante los procesos de remodelación tisular, pueden ser identificados por componentes del sistema inmune innato, tal es el caso de los receptores de reconocimiento de patrón (PRR), como los receptores tipo Toll (TLR), los receptores tipo NOD (NLR) y las helicinas tipo RIG (RLH)⁷⁷⁻⁷⁹. El reconocimiento de los agonistas de los TLRs trae como consecuencia la activación ERK $\frac{1}{2}$ y la consecuente activación del factor nuclear NF- κ B⁸⁰ que se refleja en la secreción de citocinas inflamatorias. Esto se debe a que este tipo de receptores reconocen estructuras tridimensionales altamente repetitivas, que pueden presentarse tanto en componentes de algunos microorganismos, como patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMP), o patrones moleculares asociados a daño (DAMP), como fragmentos de colágena, que inician la respuesta inflamatoria en el organismo⁸¹ que trae como

consecuencia el reclutamiento de células T y neutrófilos al sitio de inflamación, la activación de macrófagos y células endoteliales⁸². Todas estas células actúan sinérgicamente para incrementar el proceso inflamatorio por la secreción de citocinas y moléculas quimiotácticas. Aunado a ello, la actividad proinflamatoria generada por estos mecanismos, lleva a la expresión y secreción de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP), las cuales degradan componentes de la matriz extracelular incrementando el proceso inflamatorio⁸³⁻⁸⁵.

De hecho, el reconocimiento de colágena tipo I por la integrina $\alpha 2\beta 1$, puede activar mecanismos dependientes de tirosin-cinasas dirigidas a MAPKs, inicialmente a través de la fosforilación de ERK (P-ERK), misma que está involucrada en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Esta cinasa se inactiva pocas horas después de su exposición a diferencia de la forma activa de p38 que puede incrementar su expresión durante varios días posteriores de la estimulación⁸⁶, lo que se asocia con mayor producción de la MMP-13 y la síntesis de colágena tipo I^{87,88}. Por otra parte, la activación mediada por la integrina $\alpha 2\beta 1$ activa la proteína 2A fosfatasa (PP2A) por una vía dependiente de MAPs cinasas, lo que lleva a la inhibición de apoptosis mediada por FAS (sintetasa de ácidos grasos) en células Jurkat T a través de la activación de Ras Raf-1⁸⁹.

La activación celular, mediada por colágena tipo IV vía las integrinas $\alpha 1\beta 1$ es a través de la fosfolipasa C por mecanismos dependientes de fosfatidilinositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DG), con lo que las concentraciones de calcio intracelular se incrementan⁹⁰. Además del reconocimiento por las integrinas y los TLRs, estas proteínas pueden ser reconocidas por receptores de dominio discoidin y por la glicoproteína IV, que también activan la señalización dependiente de MAPKs⁹¹.

Por otra parte, la hialuronana, un polímero de alto peso molecular, al degradarse frente al daño tisular (por estímulos físicos o invasiones bacterianas), puede unirse a CD44, una glicoproteína transmembranal tipo I que se encuentra implicada en la regulación de procesos como crecimiento y

metástasis tumoral, reparación de heridas, reclutamiento de células T y neutrófilos al sitio de inflamación, además de la activación de macrófagos y células endoteliales⁸². Dichos fragmentos de hialuronana también pueden ser reconocidos por TLR-4 y -2 induciendo la producción de IL-1 β TNF- α . Los complejos de hialuronana de alto peso molecular pueden inhibir la apoptosis por la activación de NF- κ B activado por los TLRs⁸¹. De la misma manera, el biglicano y la fibronectina pueden ser reconocidos por TLR-4 e inducir la secreción de citocinas proinflamatorias que pueden también tener actividad quimiotáctica^{81,82}.

Metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP)

Para que ocurra la migración celular a través de la membrana basal de los epitelios es necesaria la degradación de los componentes de la MEC⁹². Este proceso depende de una familia de enzimas proteolíticas secretadas localmente por las células. Estas enzimas se clasifican en dos grupos: metaloproteinasas, cuya actividad depende de la unión a Ca²⁺ o a Zn²⁺ y las serin-proteasas, que presentan residuos de serina en sus regiones catalíticas. Algunas enzimas son altamente específicas para su sustrato evitando de esta manera perder la integridad de la MEC, en tanto que otras como las asociadas a la membrana plasmática de células que infiltran tejidos, requieren de una acción rápida para generar el camino entre los componentes de la MEC en la migración celular. La ruptura de las proteínas de la MEC por estas enzimas durante la migración, favorece la exposición de sitios específicos en las proteínas, que promueven la unión y migración celular^{92,93}. Adicionalmente, muchos de los productos de la ruptura proteínica tienen función pleiotrópica sobre el comportamiento de las células endoteliales, influyendo en su diferenciación, activación, migración y supervivencia⁹². Resulta, además que los fragmentos resultantes de la actividad de las MMPS, como los derivados de colágenas, pueden unirse a ligandos de TLRs y se ha propuesto que son ejemplos de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que se sabe son capaces de activar la respuesta inmune innata de una forma muy parecida a como lo hacen los PAMPs de microorganismos^{78,84}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es claro que las placas psoriásicas se asocian directamente con un proceso inflamatorio local en el que participan tanto células residentes de piel como de aquellas que migran hacia piel atraídas por diversas quimiocinas. Aparentemente, las células circulantes de sujetos psoriásicos tienen una mayor capacidad proinflamatoria que las células de sujetos sanos. A pesar de que se sabe que el proceso de migración involucra interacciones entre la matriz extracelular y las células infiltrantes, hasta el momento no se ha definido si este contacto determina diferencias en la capacidad de respuesta inflamatoria en células de sujetos psoriásicos en comparación con sujetos no psoriásicos.

JUSTIFICACION

A pesar de la alta prevalencia de la psoriasis, su fisiopatología no está suficientemente clara y su tratamiento sigue siendo primordialmente sintomático. Identificar a los diferentes componentes involucrados en la generación de las placas psoriásicas no solo nos llevara a entender mejor la enfermedad sino también incidirá en la generación de estrategias terapéuticas más efectivas.

HIPOTESIS

Las células mononucleares de sangre periférica de sujetos con psoriasis, respecto a sujetos sanos, secretarán mayor cantidad de TNF- α y presentarán mayor expresión de ERK $\frac{1}{2}$ activada, respondiendo diferencialmente ante la exposición a colágena IV y LPS.

OBJETIVOS.

GENERAL:

- Determinar en células mononucleares de sujetos sanos con y sin psoriasis la capacidad de respuesta inflamatoria que presentan después de estar en contacto con colágena IV en un modelo *in vitro*.

ESPECIFICOS:

- Cuantificar mediante citometría de flujo el TNF- α secretado por CMSPs de sujetos con y sin psoriasis expuestas o no a colágena IV y LPS.
- Determinar la activación de la cinasa ERK en CMSP sujetos psoriásicos y no psoriásicos expuestas o no a colágena IV y LPS.

MATERIAL Y METODOS

Diseño del estudio

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

Universo de estudio

Se incluyeron pacientes que acudían para su atención al centro dermatológico “Ladislao de la Pascua” de los servicios de Salud del D.F. , así como voluntarios sanos correspondientes al personal residente del mismo centro o de la UIMIQ.

Sujetos de estudio

Los sujetos seleccionados para el presente estudio se distribuyeron en dos grupos: Grupo de estudio, sujetos con psoriasis y Grupo control, sujetos sin psoriasis, que debían cumplir los siguientes criterios:

Criterios de Selección de sujetos

Los sujetos del grupo con psoriasis fueron diagnosticados y seleccionados en el “Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua”. Los sujetos control fueron tomados al azar de los integrantes de la “Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS”. A cada sujeto se le solicitó firmaran el consentimiento informado del estudio (Figura 3). Todos los sujetos se sometieron a los siguientes criterios de selección.

Criterios de Inclusión

- Sujeto de entre 18 y 50 años
- Sexo indistinto
- Diagnóstico de psoriasis en placa (exclusivo para el grupo testigo)
- Firma de la carta de Consentimiento informado

Criterios de no Inclusión

- Mujeres embarazadas
- Antecedentes personales de enfermedades autoinmunes
- Encontrarse en tratamiento inmunomodulador y/o inmunosupresor
- Presentar cualquier enfermedad que comprometa la respuesta inmune

Criterios de Exclusión

- Retirar el consentimiento informado
- Presentar leucopenia o leucocitosis
- Coagulación o hemólisis de la muestra sanguínea

Tamaño de la muestra:

Dado que se desconocía la respuesta las CMSP a los estímulos de colágena *in vitro*, aislada o en combinación con LPS, se determino realizar un ensayo dentro del modelo de prueba piloto, por lo que se concentrarían al menos 10 pacientes de cada grupo para la determinación de la variable correspondiente a la citocina TNF- α .

Descripción de Variables

Variables de Control

- Condiciones de Estimulación
 - Poli-L-Lisina
 - Colágena IV
 - Lipopolisacárido
- Número de Células mononucleares de sangre periférica
- Tiempo de incubación

Variables de Respuesta

- Secreción de TNF- α
- Expresión relativa de P-ERK ½.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

MEXICO D.F A _____ DEL 2007.

Yo _____ por medio de la presente, manifiesto:

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

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

Este procedimiento se lleva a cabo con aguja estéril, recolectando 3 ml de sangre mediante una punción de un mm de diámetro en la cara interna del brazo, la cual puede dejar una mancha temporal.

Con pleno consentimiento de lo anterior acepto voluntariamente y bajo mi estricta responsabilidad participar en el estudio “Activación diferencial de células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos y psoriásicos expuestas a matriz extracelular”. Entiendo que del presente estudio se derivarán beneficios al ampliar el conocimiento sobre la patogenia de la psoriasis.

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

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

Firma del paciente o tutor

Figura 3. Formato de la carta de consentimiento informado.

Cada uno de los participantes de este estudio estuvieron de acuerdo en el manejo y utilización de sus muestras de sangre, por lo que firmaron este documento.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica.

De cada sujeto se obtuvieron 15 mL de sangre periférica por venopunción humeral con previa asepsia de la zona. La sangre se colectó en tubos estériles que contenían 100 UI totales de heparina de sodio como anticoagulante.

El volumen de sangre obtenido se diluyó en una relación 1:1 con buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4). La suspensión obtenida se colocó en tubos de polipropileno sobre lymphoprep (Fresenius Kabi Norge AS para Axis Shield) cuidadosa y lentamente con una pipeta de 10 mL cuidando de no mezclar las fases en proporciones de un volumen de lymphoprep por cada tres volúmenes de sangre diluida. Los tubos se centrifugaron a 1062 g, con los valores de aceleración y frenado en 1 y 0 respectivamente por 20 min en una centrífuga Rotina 35 R (Hettich Zentrifugen).

Al cabo del tiempo de centrifugación, en condiciones de esterilidad, se extrajo cuidadosamente la capa correspondiente al concentrado de CMSP como se esquematiza en la figura 4.

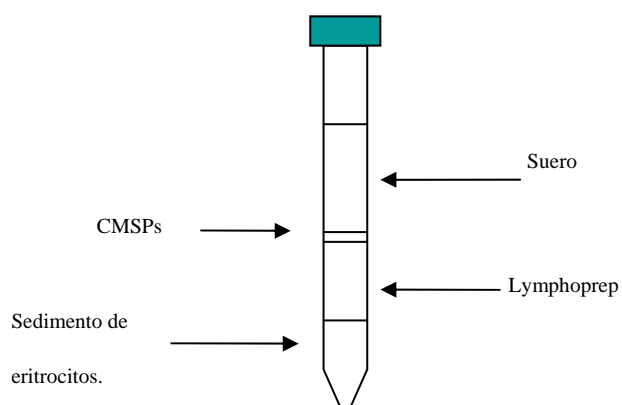


Figura 4. Esquema de separación de CMSPs por la técnica de gradiente de Ficoll

La fracción correspondiente a las CMSP recuperado se lavó agregando 10 a 12 mL de PBS estéril 1X y se centrifugó a 382 g por 5 min. Posteriormente se retiró el PBS por decantación y se repitió el procedimiento de “lavado” con PBS. Finalmente el concentrado celular se resuspendió en un mL de medio RPMI sin suero y se procedió a la verificación de la viabilidad y densidad celular utilizando azul de tripano.

La viabilidad se verificó por medio de la técnica de azul tripano que consistió en adicionar 10 µL de la suspensión de CMSP en 90 µL de una solución de azul de tripano con posterior homogenización en vortex durante 3 segundos. De la mezcla anterior, se tomaron 10 µL y se colocaron en una cámara de Neubauer para la evaluación de la viabilidad y el conteo celular en un microscopio, observando las células viables (artefactos redondos difractantes) con el objetivo de diez aumentos (10X) tomando como referencia las cuadrículas en las esquinas. Una vez contabilizados los cuatro cuadrantes se calculó el número de células de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$No.Células = \frac{Pr\ omedio_de_los_cuadrantes * 1000}{10}$$

De acuerdo al número de células obtenidas se agregó el volumen de RPMI necesario para ajustar la densidad a 6×10^6 células/mL.

Estimulación de las CMSPs

A fin de verificar si la exposición a colágena IV modifica la capacidad de respuesta ante estímulos inflamatorios de las CMSPs aisladas de sujetos sanos y con psoriasis, se diseñaron los siguientes modelos de estimulación:

Para la determinación de TNF- α secretado se colocaron 250 µL de la suspensión de CMSP (2×10^6 células/mL) por pozo, en una placa de 24 pozos con alguna de las siguientes condiciones:

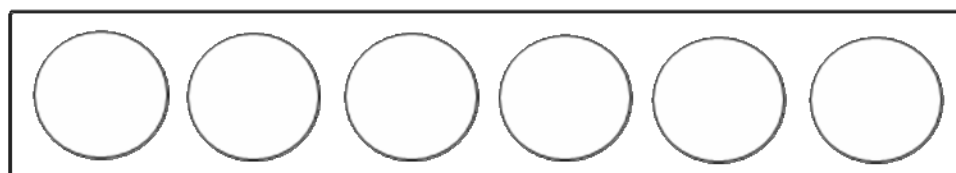
- SE: Las células se incuban durante 16 h en pozos sin recubrimiento (pre incubados con solución de carbonatos y lavados con solución de Hanks).

- LPS: las células se incuban durante 12 h en pozos correspondientes a condición SE. Posteriormente se agrega LPS 1 µg/mL por cuatro horas más.
- Col IV: las células se incuban durante 16 h en pozos previamente recubiertos con Col IV.
- Col IV LPS: las células se incuban durante 12 h en pozos previamente recubiertos con Col IV. Posteriormente se agrega LPS 1 µg/mL por cuatro horas más.

Para determinar la actividad de ERK, se colocaron 3 millones de células en 500 µL de RPMI sin suero en las siguientes condiciones de estimulación:

- pLL: Incubación sin estímulo
- pLL /LPS: Incubación de 12 h con pLL, con la adición posterior de 1µg/mL de lipopolisacárido (LPS) por 30 min.
- Col IV: Incubación con colágena tipo IV durante 12 h.
- Col IV / LPS: Incubación de 12 h con colágena tipo IV. con la adición posterior de 1µg/mL de lipopolisacárido (LPS) durante 5,15, 30 y 60 min.

Se realizó entonces la primera fase de la incubación (con y sin colágena) durante 12 h a 37 °C, 80% de humedad y 5% de CO₂ y pasado este tiempo, a los pozos de las condiciones indicadas (figura 5), se les agregó el LPS a una concentración de 1 µg/mL y se incubaron durante 15 min más.



	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Pozo 5	Pozo 6
Recubrimiento:	pLL*	PLL	Col IV**	Col IV	Col IV	Col IV
Esquema de cinética de estímulo con LPS*** (min):		15	5	15	30	60
<small>* poli-L-lisina; ** Colágeno tipo IV; *** Lipopolisacárido</small>						

Figura 5. Condiciones de estimulación de CMSP para determinación de p-ERK.

Preparación de placas para estimulación de CMSPs

Las placas para el estudio fueron recubiertas de la siguiente manera:

Recubrimiento de placas con poli-L-lisina: En condiciones de esterilidad, se adicionaron 100 μL de una solución de poli-L-lisina (pLL), de una concentración de 62.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ diluida en PBS, a placas de poliestireno de 24 pozos y se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente se retiró la solución de pLL por aspirado y se agregaron 200 μL de la solución balanceada de Hank's para restaurar el pH del pozo de cultivo (pH 7), misma que se retiró de los pozos por aspiración. Entonces la placa se dejó secar durante dos horas en condiciones estériles. Una vez recubiertas las placas, se almacenaron en refrigeración a 8 °C para su posterior utilización.

Recubrimiento de placas con colágena tipo IV: En condiciones de esterilidad, se adicionaron 200 μL de una solución de colágena IV (SIGMA) a una concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ diluida en buffer de carbonatos (pH 9, NaHCO_3 35 mM J. T. Baker y Na_2CO_3 15 mM Mallinckrodt en agua destilada) en placas de poliestireno de 24 pozos. Las placas se incubaron a 8 °C por 16 h y posteriormente se retiró por aspersión el exceso de solución. Se agregaron 200 μL de la solución balanceada de Hank's para restaurar el pH del pozo de cultivo (pH 7), misma que se retiró de los pozos por aspiración. Una vez recubiertas las placas, se almacenaron en refrigeración a 8 °C para su posterior utilización.

Cuantificación de TNF- α por CBA

Para la cuantificación directa de citocinas se utilizó un “kit” CBA comercializado por la compañía BD, que permite la cuantificación sincrónica de hasta seis citocinas humanas (Human Inflammation CBA kit BD Biosciences San Diego CA). El “kit” contiene los reactivos necesarios para realizar la cuantificación y las curvas de referencia para cada citocina analizada. Los límites de detección para cada citocina son de 20 pg/mL a 5000 pg/mL. Se realizó una primera valoración de la concentración de citocinas en las muestras analizadas con respecto a las curvas de referencia del kit y se determinó utilizar una dilución 1:100 de todos los sobrenadantes con la solución amortiguadora, tal como se sugiere en las instrucciones de uso.

El método general para la utilización del kit de CBA consiste en: colocar un volumen de la suspensión con las perlas de detección de citocinas, 1/5 de volumen de solución de detección (que contiene PE) más un volumen del sobrenadante diluido de las muestras, o bien con un volumen de las diluciones seriadas del concentrado de referencia de la curva estándar. Se agrega 1 volumen de cada muestra de análisis por tubo y se incuban en completa oscuridad durante 3 h a temperatura ambiente.

Una vez terminada la incubación se agrega 1 mL de buffer de lavado (kit CBA inflamación BD, solución F) por tubo, se centrifuga a 200 g por 5 min y se retira el sobrenadante por aspiración con pipeta. Se resuspenden las perlas de detección en aproximadamente 200 μ l de PBS.

El análisis de las muestras se realizó utilizando un citómetro de flujo CyAn ADP (Dako, Dinamarca A/S) equipado con el programa Summit (versión 4.3 Dako) para la interpretación de los datos. El ajuste del equipo se realizó utilizando los controles de calibración suministrados en el kit CBA de inflamación en humano (BD). El principio de las perlas de cuantificación se basa en la modificación de la capacidad de fluorescencia de las mismas, que se refleja en incrementos en la IMF conforme aumenta la concentración de citocina.

Evaluación de p-ERK por Western-Blot

Después de realizar los ensayos de cinéticas de activación, se determinó que en nuestro modelo, el tiempo en que se aprecia la expresión más alta de la proteína cinasa relacionada a estímulos extracelulares (ERK) en su forma fosforilada es de 15 min.

Como se menciona previamente, se colocaron 3 millones de CMSP de pacientes con psoriasis o de sujetos controles en 500 μ L de medio RPMI sin suero pozos de una multiplaca de 24 pozos. Estos pozos se encontraban recubiertos con poli L lisina (pLL) o colágena tipo IV (Col IV). Las células fueron incubadas durante 12 horas a 37°C, 80% de humedad y 5% de CO₂, y posteriormente se agregó o no LPS como estímulo proinflamatorio (1 μ g/mL) durante 15 min.

Una vez terminado el tiempo de incubación total, la placa fue centrifugada a 200 g por 5 min a fin de precipitar en el fondo de los pozos los componentes celulares. Se retiró todo el sobrenadante y se procedió a la extracción de proteínas totales.

Extracción de proteínas celulares totales. Al botón celular obtenido se le adicionó 100 μ L de la solución de lisado RIPA-PMSF (99:1) e inmediatamente las células fueron colocadas en hielo. Cada pozo fue raspado con un gendarme para coleccionar los extractos celulares y la suspensión celular obtenida fue aspirada con una punta de una micropipeta de 1 mL 3 veces con el fin de lisar las células. Entonces el extracto fue coleccionado en un tubo Eppendorf de 1 mL.

El extracto celular fue centrifugado a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C, acto seguido de la recolección del sobrenadante (extracto proteico) y depósito en un tubo Eppendorf de 600 μ L en hielo. Los tubos con los extractos proteicos fueron cuantificados por el ensayo microBradford para la cuantificación de proteínas totales con la construcción de la curva patrón correspondiente de gamma-globulina y almacenados a -20°C hasta su evaluación de la expresión de fosfo-ERK.

Western Blot. 50 µg de proteínas de cada muestra diluidas en proporciones 1:3 con Buffer de muestra 4x (azul de bromofenol 4%) fueron corridas a 90 volts en gel de poliacrilamida al 10%, según las cantidades que se muestran en el anexo 2, en buffer de corrida.

Al término de la corrida electroforética los geles se pusieron en contacto con membranas de nitrocelulosa y sometidas a electrotransferencia a 80 mA por 12 horas a 4°C en buffer de transferencia.

Una vez terminada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau, para confirmar la transferencia de proteínas, observando las bandas rojas al instante. Se lavaron las membranas con PBS-tween 20 (1X, 5.0 % respectivamente) hasta que las bandas desaparecieron. Entonces se realizó el bloqueo de la membrana con una solución de leche descremada al 5% en PBS-tween 20 durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Se adicionó el primer anticuerpo anti- ERK ½ (Phospho-p44/42 MAPK, Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology) acoplada a IgG de ratón diluida 1/5000 en solución de bloqueo e incubadas durante 24 horas a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 5 min con solución PBS-tween 20, con la consecuente adición del segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano picante (Laboratorios ZYMED Inc, San Francisco California) diluido 1/5000 en solución de bloqueo e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Al cabo de este tiempo de incubación con el anticuerpo secundario se realizaron 3 lavados de 5 min con solución PBS-tween 20 y se realizó en seguida el revelado por quimioluminiscencia con los reactivos de ECL Plus™ (GE-Healthcare) en placas de rayos X en oscuridad durante 10 min con posterior exposición a solución reveladora y solución fijadora para fotografías.

Con el fin de estandarizar la expresión de fosfo-ERK ½ se midió la expresión relativa de ERK ½ total (p44/42 MAPK, Cell Signaling) acoplada a IgG de conejo, y de la misma manera que se analizó fosfo-ERK ½ fue analizada la expresión de ERK ½ total.

Las imágenes de las placas reveladas fueron obtenidas con el escáner Hewlett Packard (HP) Desk Scan II y sometidas al análisis densitométrico con el programa SigmaGel (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos para los porcentajes celulares se analizaron con la prueba de Wilcoxon comparativa, que consiste en una prueba modificada t-student pareada no paramétrica. Los valores de concentración para las citocinas se analizaron por la prueba comparativa de medias t-student no paramétrica (U de Mann-Whitney). Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Windows, GraphPad Software (San Diego California USA, www.graphpad.com). El valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

RESULTADOS.

Pacientes y sujetos controles.

En total 21 personas con diagnóstico de psoriasis en placa y 14 sujetos sanos decidieron participar voluntariamente en el estudio firmando la carta de consentimiento informado. Todos los sujetos cumplieron los criterios de inclusión señalados anteriormente y en la Tabla 3 se muestran los resultados demográficos de la población estudiada.

Tabla 3. Resultados demográficos de sujetos psoriásicos y sujetos sanos		
	Sujetos con psoriasis (n=21)	sujetos sanos (n=14)
Edad	22 - 49 años (Promedio de 36 años)	23 - 55 años (Promedio de 39 años)
	Relación Femenino/Masculino	
Sexo	2/3	2/3

Mayor secreción de TNF- α por las CMSPs de sujetos con psoriasis

Al sobrenadante de cada condición se le realizó la cuantificación de la citocina proinflamatoria TNF- α utilizando un sistema CBA que consiste en la captura de citocinas por perlas con fluorescencia y el análisis por citometría de flujo con una curva de referencia incluida en el sistema CBA. La curva obtenida mostró un coeficiente de correlación lineal (r^2) igual a 0.9996 con lo que se dio por válido el sistema de cuantificación.

Como se esperaba, la concentración de TNF- α aumento significativamente al exponer las células ante un estímulo de activación como es el LPS respecto a las que no se les expuso, tanto en sujetos con psoriasis como en sujetos sanos (SE vs LPS; sanos: 2.075 \pm 1.291 vs 6.36 \pm 2.36; psoriásicos: SE 5.359 \pm 2.11 vs 18.95 \pm 7.29 pg/mL). Llama la atención que en todas las demás condiciones de estimulación, incluso la basal, las CMSP de los sujetos con psoriasis secretan significativamente mayor cantidad de esta citocina respecto a lo que

secretan las CMSP de sujetos sin psoriasis (sujetos sanos: SE 2.075+/-1.291 pg/mL; LPS 6.36+/-2.36 pg/mL, Col IV 2.477 +/-0.62 pg/mL y Col IV-LPS 3.828+/-1.24 pg/mL vs sujetos psoriásicos: SE 5.359+/-2.11 pg/mL, LPS 18.95+/-7.29 pg/mL, Col IV 8.493+/-2.51 pg/mL; Col IV-LPS 13.55+/-3.18 pg/mL; p<0.05 en cada caso) (Figura 6).

La exposición a colágena IV disminuye la secreción de TNF-a inducida por LPS

Ahora bien, respecto a la influencia de la colágena sobre la capacidad de respuesta proinflamatoria (secreción de TNF-a en este caso), primeramente, la incubación de las CMSP solo con colágena IV mostró un discreto incremento respecto a la condición sin estímulo, que no resultó significativo en ninguno de los grupos de sujetos estudiados. De la misma manera se observa una discreta tendencia a aumentar mayor secreción de la citocina al agregar LPS a la incubación previa con colágena IV (ColIV/LPS vs ColIV: sujetos sanos 3.828+/-1.24 pg/mL vs 2.477 +/-0.62 pg/mL; sujetos con psoriasis 13.55+/-3.18 pg/mL vs 8.493+/-2.510 pg/mL). Sin embargo, al comparar el estímulo de colágena IV y LPS respecto al estímulo de LPS sin incubación previa con colágena se observa una menor secreción de la citocina cuando el estímulo de LPS se da después de la exposición a colágena IV. Esta diferencia resulta significativa en el grupo de pacientes con psoriasis (Col IV-LPS 13.55+/-3.18 pg/mL vs LPS 18.95+/-7.29 pg/mL, p<0.034)(Figura 6).

Hay menor cantidad de P-ERK ½ después de la exposición a colágena IV

ERK ½ es un miembro de las MAPK que se activa ante diversos estímulos, como son estímulos proinflamatorios a través de diversas vías de señalización, que se manifiesta como la fosforilación de los residuos Thr202 y Tyr204. Para analizar la expresión de la forma activa de esta cinasa ante los diversos estímulos en CMSP de sujetos con psoriasis y sujetos sanos se midió la expresión relativa de la proteína fosforilada (P-ERK ½) mediante la técnica de Western-Blot. Como se observa en la Figura 7, la expresión máxima de P-ERK se observa a partir de los 15 min posteriores a la exposición a LPS, que se mantiene durante 15 min más y comienza a disminuir después de los 30 min.

Esta cinética se da tanto en el grupo de psoriásicos como en el grupo de sujetos sanos.

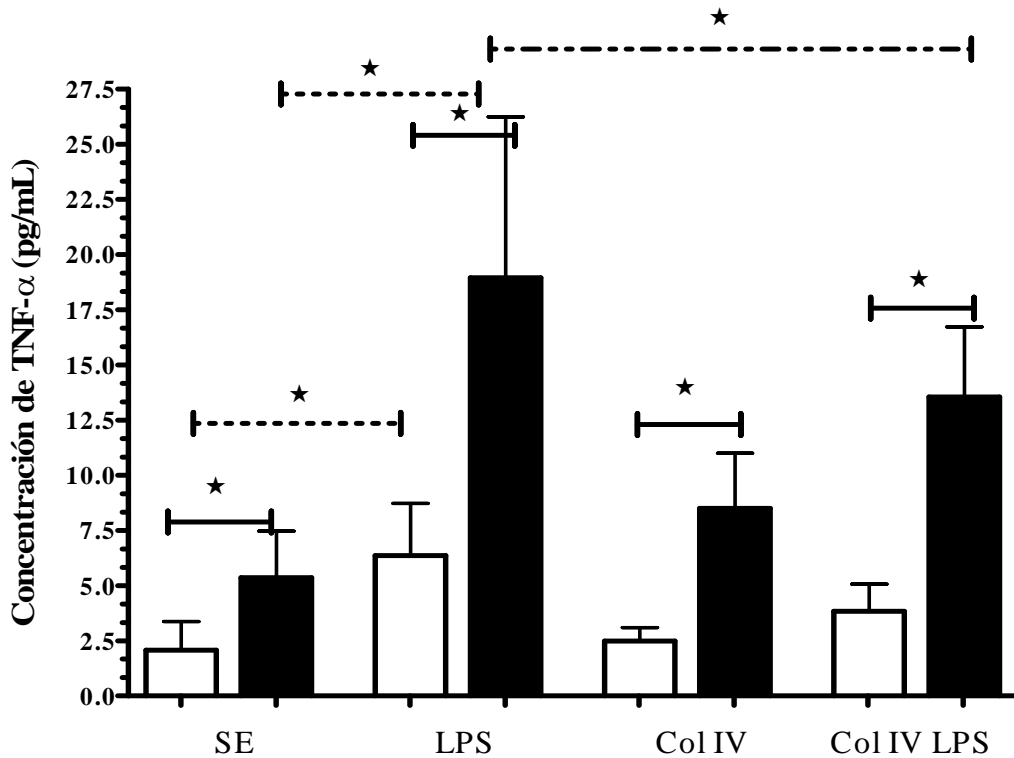


Figura 6. La secreción de TNF- α de CMSPs de sujetos psoriásicos está incrementada ante diferentes condiciones de estimulación.

Las concentraciones de TNF- α fueron determinadas en el sobrenadante de CMSP aisladas de sujetos no psoriásicos \square (n = 11) y sujetos psoriásicos \blacksquare (n = 6) que se sometieron a diferentes condiciones de estimulación: SE: Sin estímulo, LPS: Lipopolisacárido, Col IV: Colágena tipo IV, Col IV/LPS: Colágena tipo IV y Lipopolisacárido. Las barras representan los valores promedios y el error estándar. Prueba estadística *t-student*. Valores significativos representados por el símbolo *. P < 0.05

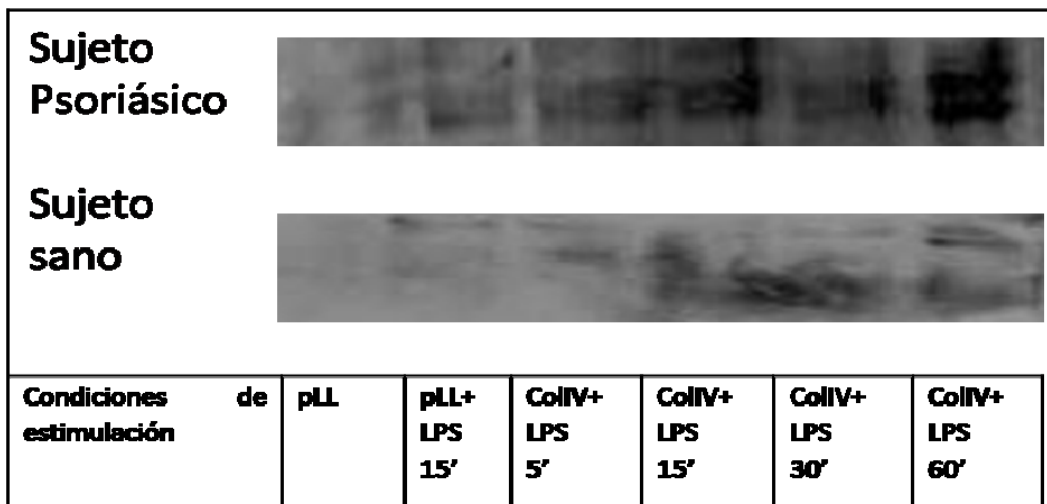


Figura 7. La expresión máxima sostenida de P-ERK $\frac{1}{2}$ en CMSP de sujetos psoriásicos y sujetos sanos expuestas a Col IV y pLL se observa en 15 min de estimulación con LPS.

La expresión de P-ERK por análisis en Western-Blot por quimioluminiscencia durante 10 min analizada como la intensidad de la banda. pLL; poli-L-lisina, ColIV; colágena de tipo IV, LPS; Lipopolisacárido.

Tomando entonces este tiempo de 15 min de estimulación con LPS como referencia, procedimos a comparar la expresión de P-ERK ½ entre CMSP de sujetos con psoriasis y de sujetos sanos. Nuevamente, se determinó tanto la expresión de ERK total (como control interno de proteína en el gel), como se la expresión relativa de P-ERK ½ con el uso de análisis densitométrico sobre las autoradiografías obtenidas con la técnica de Western-Blot a la que se sometieron los extractos de proteínas totales de las CMSP expuestas a Col IV y pLL (poli L lisina) durante 12 hrs y posteriormente estimulados con LPS por 15 min más. Los resultados obtenidos muestran que tras la exposición de las CMSP a LPS la expresión de P-ERK disminuye con la exposición a Col IV hasta en un 50 % en comparación a las CMSP incubadas solo con poli L-lisina; esta disminución se da tanto en CMSP de sujetos sanos como con psoriasis (sanos: 100% pLL **vs** 52.61+/- 9.754% ColIV; sujetos con psoriasis 100% pLL **vs** 55.60+/-7.532% ColIV) (Figura 8). Ahora bien, cuando comparamos la expresión de P-ERK de CMSP incubadas con Col IV-LPS disminuye con pLL, observamos una disminución de 10% en ambos grupos (pLL vs ColIV-LPS; sanos: 100%pLL vs 88.90+/- 6.263% ColIV-LPS; sujetos con psoriasis 100% pLL vs 86.83+/-5.051% ColIV-LPS) (Figura8).

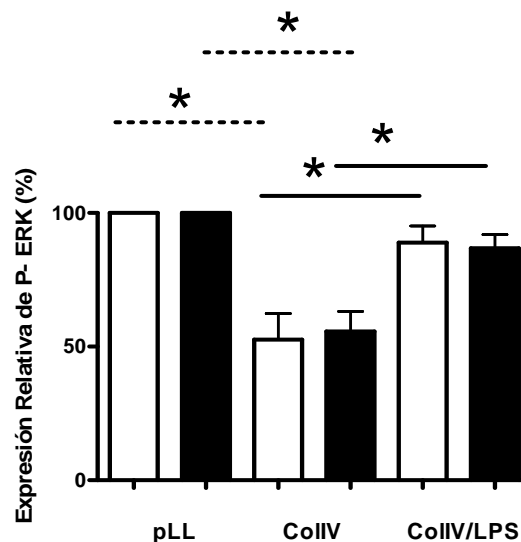


Figura 8. La expresión relativa ERK de CMSP es diferencialmente activada por la exposición, o no, a ColIV y LPS.

La expresión relativa de P-ERK analizada por densitometría se muestra en porcentajes. El grupo de CMSP de sujetos sanos □ (n = 3) y sujetos psoriásicos ■ (n = 4) que fueron sometidas a diferentes condiciones de estimulación: pLL; poli-L-Lisina, Col IV: Colágena tipo IV, Col IV/LPS: Colágena tipo IV más Lipopolisacárido. Las barras representan los valores promedios y el error estándar. Prueba estadística *t-student*. Valores significativos representados por el símbolo *. P<0.05.

A fin de verificar si este efecto sobre la expresión relativa de P-ERK $\frac{1}{2}$ producido por la exposición a colágena influencia de alguna manera la respuesta frente a LPS, se colocaron a las CMSP con pLL sin LPS, pLL sin LPS y con Col IV con LPS. Tal como esperábamos, el estímulo con LPS de las CMSP (solo expuestas previamente a pLL) es casi tres veces la expresión de P-ERK $\frac{1}{2}$ respecto el estímulo pLL (pLL **vs** pLL-LPS; sanos: 100 % pLL vs 37.54 \pm 8.769% pLL-LPS; psoriásicos 100 % pLL **vs** 36.58 \pm 3.209 pLL-LPS). Interesantemente, observamos exponer a las CMSP a colágena IV disminuye casi en 40% la expresión de P-ERK $\frac{1}{2}$ en comparación a la respuesta que se genera ante LPS sin esta exposición previa a colágena IV (sanos: 100% LPS vs 49.73 \pm 7.041% Col IV-LPS; psoriásicos 100% vs 58.40 \pm 10.21 Col IV-LPS) (Figura 9). Es de resaltar que esta disminución en la expresión de P-ERK $\frac{1}{2}$ se presenta de la misma manera en CMSP de sujetos psoriásicos y no psoriásicos.

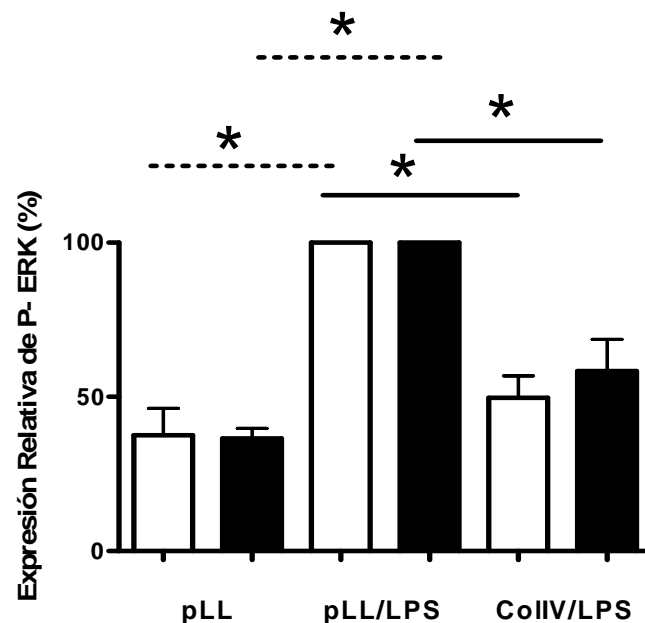


Figura 9. La expresión P-ERK está disminuida tras exponer las células a ColIV. La expresión relativa de P-ERK analizada por densitometría se muestra en porcentajes. El grupo de CMSP de sujetos sanos □ (n = 4) y sujetos psoriásicos ■ (n = 4) que fueron sometidas a diferentes condiciones de estimulación: pLL: poli-L-Lisina, pLL/LPS: poli-L-Lisina más Lipopolisacárido, ColIV/LPS: Colágena tipo IV y Lipopolisacárido. Las barras representan los valores promedios y el error estándar. Prueba estadística Mann Whitney. Valores significativos representados por el símbolo *. P<0.05.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria de evolución crónica que se manifiesta en la piel y articulaciones, que aun cuando no es mortal, deteriora importantemente la calidad de la vida de los pacientes y su tratamiento, que es únicamente sintomático, puede alcanzar los catorce mil euros por año^{94,95}. Cada año se suman entre 45 y 60 nuevos casos por cada cien mil habitantes y dado que esta enfermedad resulta crónica e incurable hasta en 70% de los casos, constituye un importante problema de salud dentro de la consulta dermatológica⁹⁶.

Sí bien se han reconocido múltiples factores capaces de desencadenar la aparición de las lesiones y que existen múltiples evidencias de que la respuesta inflamatoria local favorece la generación de las lesiones en piel, todavía no se ha dilucidado cuál es la secuencia de eventos involucrado en la fisiopatología de la psoriasis. Uno de tantos factores que pueden estar involucrados es el reconocimiento de la matriz extracelular por parte de las células que infiltran la piel hacia las lesiones, tal como lo sugieren el que existe mayor expresión de integrinas $\alpha 1$ en sujetos psoriásicos²¹. Por tal en este trabajo nos propusimos dilucidar sí el contacto de células mononucleares periféricas, que son convocadas por los factores quimiotácticos hacia los tejidos⁶¹, con colágena IV modifican de alguna forma la capacidad de respuesta inflamatoria de estas células.

Así, en este estudio, reclutamos un total de 21 pacientes, todos los cuales fueron diagnosticados como sujetos con psoriasis en placas y cumplían cabalmente los criterios de no padecer otras enfermedades crónicas o estar recibiendo tratamiento sistémico que modifique la respuesta inflamatoria y/o inmune en general. Adicionalmente, nuestro grupo de estudio presento, respecto con el grupo de sujetos control, constituido por 14 sujetos no psoriásicos, paridad respecto a la edad (medias de 39 vs 36 años, respectivamente), así como la relación entre personas de sexo femenino y masculino son las mismas entre ambos grupos de sujetos analizados. De todos los sujetos reclutados se aislaron CMSP, para ser incubados con la colágena y

posteriormente verificada su capacidad de respuesta frente a LPS, ya que como es sabido, este tipo de células, monocitos y linfocitos, tienen la capacidad de responder ante estímulos como el LPS a través de la activación de receptores tipo Toll (TLRs)^{97,98}. Los efectos repostados que tal reconocimiento traen en consecuencia incluye la secreción de moléculas proinflamatorias como IL-1 β , IL-8 y TNF- α ⁹⁹. Tales eventos requieren de la activación de diferentes cascadas de señalización intracelular que activen a los factores de transcripción adecuados para inducir la expresión de los genes de estas citocinas^{38,39}. En el caso de TNF- α inducido por LPS, se ha reportado que es dependiente de NF- κ B, así como de la actividad de las MAP cinasas, entre las que se encuentran la cinasa c-Jun N-terminal y a las dos isoformas de ERK (ERK 1 y ERK2)¹⁰⁰⁻¹⁰². En este estudio determinamos la capacidad de secreción de TNF alfa al estimular a las CMSP con LPS y encontramos, como lo esperábamos de acuerdo a los diferentes reportes que señalan que en los pacientes psoriásicos existe una respuesta sistémica proinflamatoria^{18,103,104}, mayor secreción de la citocina por células de psoriásicos respecto a las células de sujetos sanos. Y esto se dio en todas las condiciones de estimulación exploradas. Interesantemente observamos una disminución en la capacidad de secreción frente a LPS por las células si estas se habían expuesto previamente a colágena. Lo anterior resulta contrastante con los reportes previos que sugerían el reconocimiento de las colágenas por diferentes integrinas, puede favorecer la secreción de metaloproteinasas, las cuales rompen a las colágenas y los fragmentos resultantes pueden ser reconocidos por los TLRs y constituir así patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), activando la respuesta inmune innata^{78,84}. Además, en un estudio previo realizado en nuestro grupo de trabajo se encontró que al exponer las CMSP de personas con psoriasis a colágena tipo I y IV por 12 horas, había mayor secreción de IL-1 β respecto a CMSP de personas sin psoriasis. Concordantemente con este efecto proinflamatorio, la secreción de la citocina antiinflamatoria IL-10 era menor en CMSP de sujetos psoriásicos²⁷. Estas diferencias en los efectos que la colágena presenta sobre la producción de citocinas inducidas por el LPS, pueden deberse a que son diferentes las vías de señalización involucradas en la secreción de las citocinas. Así, la secreción de IL-1 β es dependiente de la

activación del complejo multiproteico del inflamasoma, que es una plataforma de multiproteínas citosólicas que permite la activación de las caspasas proinflamatorias 1 y 3, y las cuales transforman el precursor de interleucina-1 β (pro-IL-1 β) a la forma activa, lo que conduce a una poderosa respuesta inflamatoria. La activación de estas moléculas no depende directamente de MAPK en macrófagos¹⁰⁵, aunque sí en queratinocitos¹⁰⁶. Mientras que la producción de TNF- α puede ser inducida por la vía de NF- κ B y MAP cinasas. El incremento de la actividad sostenida de p38 ante la exposición a colágena IV quizás sea el responsable, en cierta medida, de la secreción aumentada de citocinas proinflamatorias como IL-8, como se reportó en células epiteliales pulmonares¹⁰⁷.

Cuando exploramos si la exposición de las CMSP a colágena modificaba la expresión de P-ERK, la forma activa, de estas MAP cinasas, encontramos, que, acorde con la disminución en la secreción de TNF- α , el contacto con colágena resulta en una disminución en la expresión de P-ERK en un 50% en comparación a aquellas que no fueron expuestas y que este efecto menor expresión de P-ERK permanece aún después de estimular a las células con LPS). Este evento podría ser correspondiente con los resultados encontrados por Ivaska et. al. en 1999 y Basson & Sander en el 2003, en los que la colágena tipo IV induce la activación de ERK 1/2 en células Jurkat T y Caco-2 epiteliales intestinales, respectivamente, por el reconocimiento de las integrinas α 1 β 1 y que esta activación solo dura unos pocos minutos, con lo que se sugiere que el reconocimiento de colágena, activa a las células por poco tiempo ya que por mecanismos de retroalimentación negativa, esta respuesta es inhibida respecto a la vía de señalización de ERK 1/2 y no otras MAPK que pueden durar varios días como p38^{86,108,109}.

Sin embargo, en la expresión de P-ERR 1/2 en las CMSP no se vio afectada por la exposición a colágena IV en sujetos psoriásicos respecto a los sujetos sanos, de manera tal que las diferencias encontradas en la producción de TNF- α no se deben completamente a la expresión de la forma activa de ERK 1/2. En este caso podrían mantenerse por la expresión sostenida de la

forma activa de p38, cuyo efecto promotor sobre la producción de TNF- α en puede durar varios días en macrófagos¹¹⁰. El incremento de la actividad de moléculas inflamatorias y el mantenimiento de estas en queratinocitos, y/o las células epiteliales, ha sido explicado en el grupo de Johansen, C, 2005 al estudiar piel de lesiones psoriásicas reportó incrementos en la expresión de las formas fosforiladas (activas) de como p38, ERK 1 y 2 (o sea, P-ERK)¹¹¹. Estos autores proponen que la fosforilación de estas proteínas contribuye a la actividad inflamatoria y en consecuencia a la perpetuación de las lesiones. Ahora bien, dado que las muestras analizadas por este grupo consistieron en biopsias de piel completas, la actividad que reportan es la sumatoria de todas las células que se encuentran en el tejido, incluyendo queratinocitos, fibroblastos y a todas las células inmunológicas, tanto las residentes como las infiltrantes de piel. En nuestro caso, nos centramos en valorar la capacidad de expresión de P-ERK únicamente en las células con potencialidad de infiltrar piel, por lo que es factible que otras vías de señalización sean las involucradas de generar la respuesta proinflamatoria. Así, quedaría por explorar si moléculas como las cinasas de Janus (JNKs) o bien c-Jun, involucradas en las respuestas ante el stress celular, pudieran estar activas en estas células de pacientes psoriásicos, ya que el ambiente proinflamatorio sistémico reportado, constituye, precisamente una señal de estrés celular.

CONCLUSIÓN

Las CMSP de sujetos con psoriasis muestran, respecto a CMSP de sujetos sanos, una mayor capacidad de secreción de TNF- α ante el estímulo de LPS. Ahora bien, aunque la exposición previa con Col IV disminuye esta secreción de TNF- α , esta sigue siendo mayor que la de CMSP de sujetos sanos en la misma condición. Es factible que la activación de ERK $\frac{1}{2}$ guarde relación directa con este efecto “atenuador” en la producción de TNF- α , aunque parece que no participa directamente en la respuesta diferencial que las CMSP de sujetos psoriásicos muestran respecto a CMSP de sujetos sanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Griffiths, C. E. and J. N. Barker. 2007. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 370:263-271.
2. Kobayashi, Y. 2006. Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit Rev.Immunol.* 26:307-316.
3. Lebwohl, M. 2003. Psoriasis. *Lancet* 361:1197-1204.
4. de Arruda, L. H. and A. P. De Moraes. 2001. The impact of psoriasis on quality of life. *Br.J Dermatol.* 144 Suppl 58:33-36.
5. Liu, Y., J. G. Krueger, and A. M. Bowcock. 2007. Psoriasis: genetic associations and immune system changes. *Genes Immun.* 8:1-12.
6. Roberts, A. I., R. E. Brolin, and E. C. Ebert. 1999. Integrin alpha1beta1 (VLA-1) mediates adhesion of activated intraepithelial lymphocytes to collagen. *Immunology* 97:679-685.
7. Bowcock, A. M. and J. G. Krueger. 2005. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat.Rev.Immunol.* 5:699-711.
8. Koo, J., E. Lee, C. S. Lee, and M. Lebwohl. 2004. Psoriasis. *J Am.Acad.Dermatol.* 50:613-622.
9. Bos, J. D., M. A. de Rie, M. B. Teunissen, and G. Piskin. 2005. Psoriasis: dysregulation of innate immunity. *Br.J.Dermatol.* 152:1098-1107.
10. Guilhou, J. J. and J. P. Moles. 2008. New hypotheses in the genetics of psoriasis and other 'complex' diseases. *Dermatology* 216:87-92.
11. Vasilopoulos, Y., K. Walters, M. J. Cork, G. W. Duff, G. S. Sago, and R. Tazi-Ahnini. 2008. Association analysis of the skin barrier gene cystatin A at the PSORS5 locus in psoriatic patients: evidence for interaction between PSORS1 and PSORS5. *Eur.J Hum.Genet.*
12. Luba, K. M. and D. L. Stulberg. 2006. Chronic plaque psoriasis. *Am.Fam.Physician.* 73:636-644.
13. Gaspari, A. A. 2006. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J.Am.Acad.Dermatol.* 54:S67-S80.
14. Fitzpatrick, T. B. *Dermatología en Medicina General.* Panamericana.
15. Myers, W. A., A. B. Gottlieb, and P. Mease. 2006. Psoriasis and psoriatic arthritis: clinical features and disease mechanisms. *Clin.Dermatol.* 24:438-447.
16. Higashida, B. *Ciencias de la Salud.* McGraw-Hill.

17. Ganong, W. *Fisiología Médica*.
18. Gudjonsson, J. E., A. Johnston, H. Sigmundsdottir, and H. Valdimarsson. 2004. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin.Exp.Immunol.* 135:1-8.
19. Lemster, B. H., P. B. Carroll, H. R. Rilo, N. Johnson, A. Nikaein, and A. W. Thomson. 1995. IL-8/IL-8 receptor expression in psoriasis and the response to systemic tacrolimus (FK506) therapy. *Clin.Exp.Immunol.* 99:148-154.
20. Bos, J. D. *Skin Immune System: Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology*. CRC Press.
21. Conrad, C., O. Boyman, G. Tonel, A. Tun-Kyi, U. Laggner, F. A. de, V. Kotelianski, H. Gardner, and F. O. Nestle. 2007. Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nat.Med.* 13:836-842.
22. Simonetti, O., G. Lucarini, G. Goteri, A. Zizzi, G. Biagini, M. L. Lo, and A. Offidani. 2006. VEGF is likely a key factor in the link between inflammation and angiogenesis in psoriasis: results of an immunohistochemical study. *Int.J.Immunopathol.Pharmacol.* 19:751-760.
23. Yusuf-Makagiansar, H., T. V. Yakovleva, B. A. Tejo, K. Jones, Y. Hu, G. M. Verkhivker, K. L. Audus, and T. J. Siahaan. 2007. Sequence recognition of alpha-LFA-1-derived peptides by ICAM-1 cell receptors: inhibitors of T-cell adhesion. *Chem.Biol.Drug Des* 70:237-246.
24. Lowes, M. A., A. M. Bowcock, and J. G. Krueger. 2007. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445:866-873.
25. Robert, C. and T. S. Kupper. 1999. Inflammatory Skin Diseases, T Cells, and Immune Surveillance. *N Engl J Med* 341:1817-1828.
26. Gottlieb, A. B., B. Lifshitz, S. M. Fu, L. Staiano-Coico, C. Y. Wang, and D. M. Carter. 1986. Expression of HLA-DR molecules by keratinocytes, and presence of Langerhans cells in the dermal infiltrate of active psoriatic plaques. *J.Exp.Med.* 164:1013-1028.
27. Sánchez López Javier A. Respuesta de células mononucleares de sangre periférica se sujetos psoriásicos y no psoriásicos expuestas a proteínas de matriz extracelular. 2008.

Ref Type: Thesis/Dissertation

28. Chang, J. C., L. R. Smith, K. J. Froning, B. J. Schwabe, J. A. Laxer, L. L. Caralli, H. H. Kurland, M. A. Karasek, D. I. Wilkinson, D. J. Carlo, and . 1994. CD8+ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V beta 3 and/or V beta 13.1 genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:9282-9286.
29. Beutner, E. H., M. Jarzabek-Chorzelska, S. Jablonska, T. P. Chorzelski, and G. Rzeska. 1978. Autoimmunity in psoriasis. A complement immunofluorescence study. *Arch.Dermatol.Res.* 261:123-134.

30. Gamo, R. and J. L. Lopez-Esteban. 2006. Biologic therapy and psoriasis. *Actas Dermosifiliogr.* 97:1-17.
31. Tanzer, M. L. 2006. Current concepts of extracellular matrix. *J.Orthop.Sci.* 11:326-331.
32. Singri, P., D. P. West, and K. B. Gordon. 2002. Biologic therapy for psoriasis: the new therapeutic frontier. *Arch.Dermatol.* 138:657-663.
33. Banno, T., A. Gazel, and M. Blumenberg. 2004. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J.Biol.Chem.* 279:32633-32642.
34. Gottlieb, A. B., F. Chamian, S. Masud, I. Cardinale, M. V. Abello, M. A. Lowes, F. Chen, M. Magliocco, and J. G. Krueger. 2005. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J.Immunol.* 175:2721-2729.
35. Krueger, G. and K. Callis. 2004. Potential of tumor necrosis factor inhibitors in psoriasis and psoriatic arthritis. *Arch.Dermatol.* 140:218-225.
36. Wakefield, P. E. J. W. D. S. C. P. & M. M. S. 1991. Tumor necrosis factor. *Am Acad Dermatol* 24:675-685.
37. Nickoloff, B. J., G. D. Karabin, J. N. Barker, C. E. Griffiths, V. Sarma, R. S. Mitra, J. T. Elder, S. L. Kunkel, and V. M. Dixit. 1991. Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor-alpha in psoriasis. *Am J Pathol* 138:129-140.
38. Old, L. J. 1987. Tumour necrosis factor. Another chapter in the long history of endotoxin. *Nature* 330:602-603.
39. Wei, Z., J. S. Downey, L. Yingqiu, and H. Jiahuai. 1999. Co-ordinated regulation of TNF expression by multiple MAP kinase pathways. *Journal of Endotoxin Research* 5:239-243.
40. Pennica, D., G. E. Nedwin, J. S. Hayflick, P. H. Seeburg, R. Derynck, M. A. Palladino, W. J. Kohr, B. B. Aggarwal, and D. V. Goeddel. 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312:724-729.
41. Old, L. J. 1985. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230:630-632.
42. Beutler, B., D. Greenwald, J. D. Hulmes, M. Chang, Y. C. Pan, J. Mathison, R. Ulevitch, and A. Cerami. 1985. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316:552-554.
43. Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.

44. DeFranco, A. L., M. T. Crowley, A. Finn, J. Hambleton, and S. L. Weinstein. 1998. The role of tyrosine kinases and map kinases in LPS-induced signaling. *Prog.Clin.Biol Res.* 397:119-136.
45. Sanghera, J. S., S. L. Weinstein, M. Aluwalia, J. Girn, and S. L. Pelech. 1996. Activation of multiple proline-directed kinases by bacterial lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Immunol* 156:4457-4465.
46. Han, J., J. D. Lee, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch. 1993. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *Journal of Biological Chemistry* 268:25009-25014.
47. Weinstein, S. L., M. R. Gold, and A. L. DeFranco. 1991. Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 88:4148-4152.
48. Hambleton, J., S. L. Weinstein, L. Lem, and A. L. DeFranco. 1996. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 93:2774-2778.
49. Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs, and R. J. Ulevitch. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.
50. Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Keys, S. W. Land vatter, J. E. Strickler, M. M. McLaughlin, I. R. Siemens, S. M. Fisher, G. P. Livi, J. R. White, J. L. Adams, and P. R. Young. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739-746.
51. Dong, Z., X. Qi, and I. J. Fidler. 1993. Tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases is necessary for activation of murine macrophages by natural and synthetic bacterial products. *J.Exp.Med.* 177:1071-1077.
52. Swantek, J. L., M. H. Cobb, and T. D. Geppert. 1997. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol.Cell.Biol.* 17:6274-6282.
53. Beutler, B. and A. Cerami. 1986. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320:584-588.
54. Ono, K. and J. Han. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* 12:1-13.
55. Weitzman, J. B. 2000. Quick guide. Jnk. *Curr.Biol* 10:R290.
56. Kato, Y., V. V. Kravchenko, R. I. Tapping, J. Han, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee. 1997. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J* 16:7054-7066.

57. New, L. and J. Han. 1998. The p38 MAP kinase pathway and its biological function. *Trends Cardiovasc.Med* 8:220-228.
58. Seger, R. and E. G. Krebs. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9:726-735.
59. Ferrell, J. and R. R. Bhatt. 1997. Mechanistic Studies of the Dual Phosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 272:19008-19016.
60. Karin, M. 2005. Inflammation-activated Protein Kinases as Targets for Drug Development. *Proc Am Thorac Soc* 2:386-390.
61. Goldsby, R. A., T. J. Kindt, B. A. Osborne, and J. Kuby. *Immunologia*. McGraw-Hill, Mexico.
62. Rose, D. M., R. Alon, and M. H. Ginsberg. 2007. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol.Rev.* 218:126-134.
63. Vestweber, D. 2007. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol.Rev.* 218:178-196.
64. Vestweber, D. 1992. Selectins: cell surface lectins which mediate the binding of leukocytes to endothelial cells. *Semin.Cell Biol.* 3:211-220.
65. Salmi, M. and S. Jalkanen. 2005. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat.Rev.Immunol.* 5:760-771.
66. Gumbiner, B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357.
67. Yonekawa, K. and J. M. Harlan. 2005. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J.Leukoc.Biol.* 77:129-140.
68. Wang, T. W., J. S. Sun, Y. C. Huang, H. C. Wu, L. T. Chen, and F. H. Lin. 2006. Skin basement membrane and extracellular matrix proteins characterization and quantification by real time RT-PCR. *Biomaterials* 27:5059-5068.
69. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science.
70. Hynes, R. O. and Q. Zhao. 2000. The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol.* 150:F89-F96.
71. Aumailley, M. and B. Gayraud. 1998. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J.Mol.Med.* 76:253-265.
72. Bosman, F. T. and I. Stamenkovic. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J.Pathol.* 200:423-428.

73. Mould, A. P. and M. J. Humphries. 2004. Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction? *Curr.Opin.Cell Biol.* 16:544-551.
74. Franzke, C. W., P. Bruckner, and L. Bruckner-Tuderman. 2005. Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology. *J Biol.Chem.* 280:4005-4008.
75. Myllyharju, J. and K. I. Kivirikko. 2001. Collagens and collagen-related diseases. *Ann.Med.* 33:7-21.
76. Khoshnoodi, J., K. Sigmundsson, J. P. Cartiailler, O. Bondar, M. Sundaramoorthy, and B. G. Hudson. 2006. Mechanism of chain selection in the assembly of collagen IV: a prominent role for the alpha2 chain. *J.Biol.Chem.* 281:6058-6069.
77. Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
78. Kono, H. and K. L. Rock. 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8:279-289.
79. Meylan, E., J. +. Tschopp, and M. Karin. 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442:39-44.
80. Carter, N. A., J. Dye, A. Palvanov, and T. L. Rothstein. 2007. TLR agonists induce an alternate pathway for BCR-induced ERK phosphorylation and NF- κ B activation. *J Immunol* 178:S125-S12d.
81. Morwood, S. R. and L. B. Nicholson. 2006. Modulation of the immune response by extracellular matrix proteins. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* 54:367-374.
82. Jiang, D. and P. W. Noble. 2006. Matrix Regulation of Lung Injury, Inflammation and Repair The Role of the Innate Immunity. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 3:401-404.
83. Parks, W. C., C. L. Wilson, and Y. S. Lopez-Boado. 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4:617-629.
84. Thomas, A. H., E. R. Edelman, and C. M. Stultz. 2007. Collagen fragments modulate innate immunity. *Exp.Biol Med (Maywood.)* 232:406-411.
85. Burke, B. 2004. The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity. *Immunobiology* 209:51-56.
86. Ivaska, J., H. Reunanen, J. Westermarck, L. Koivisto, V. M. Kahari, and J. Heino. 1999. Integrin alpha2beta1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha2 cytoplasmic tail. *J Cell Biol.* 147:401-416.

87. Ravanti, L., J. Heino, C. Lopez-Otin, and V. M. Kahari. 1999. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 274:2446-2455.
88. Ivaska, J. and J. Heino. 2000. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57:16-24.
89. Chetoui, N., S. Gendron, E. Chamoux, and F. Aoudjit. 2006. Collagen type I-mediated activation of ERK/MAP Kinase is dependent on Ras, Raf-1 and protein phosphatase 2A in Jurkat T cells. *Mol Immunol* 43:1687-1693.
90. Somogyi, L., Z. Lasic, S. Vukicevic, and H. Banfic. 1994. Collagen type IV stimulates an increase in intracellular Ca²⁺ in pancreatic acinar cells via activation of phospholipase C. *Biochem.J* 299 (Pt 3):603-611.
91. Vogel, W. F. 2001. Collagen-receptor signaling in health and disease. *Eur J Dermatol.* 11:506-514.
92. Streuli, C. 1999. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:634-640.
93. Friedl, P. 2004. Dynamic imaging of cellular interactions with extracellular matrix. *Histochem.Cell Biol.* 122:183-190.
94. Balkrishnan, R., M. J. Bhosle, F. T. Camacho, and R. T. Anderson. 2006. Predictors of medication adherence and associated health care costs in an older population with overactive bladder syndrome: a longitudinal cohort study. *J Urol.* 175:1067-1071.
95. Feldman, S. R. and G. G. Krueger. 2005. Psoriasis assessment tools in clinical trials. *Ann Rheum Dis* 64:ii65-ii68.
96. Traub, M. and K. Marshall. 2007. Psoriasis--pathophysiology, conventional, and alternative approaches to treatment. *Altern.Med.Rev.* 12:319-330.
97. Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol.Immunol* 40:845-859.
98. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124:783-801.
99. Delves, P. J. and I. M. Roitt. 2000. The Immune System- First of Two Parts. *N Engl J Med* 343:37-49.
100. Guha, M., M. A. O'Connell, R. Pawlinski, A. Hollis, P. McGovern, S. F. Yan, D. Stern, and N. Mackman. 2001. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 98:1429-1439.

101. Dumitru, C. D., J. D. Ceci, C. Tsatsanis, D. Kontoyiannis, K. Stamatakis, J. H. Lin, C. Patriotis, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, G. Kollias, and P. N. Tsiachlis. 2000. TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103:1071-1083.
102. van der Bruggen, T., S. Nijenhuis, E. van Raaij, J. Verhoef, and B. Sweder van Asbeck. 1999. Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Human Monocytes Involves the Raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 Pathway. *Infect.Immun.* 67:3824-3829.
103. Bachelez, H. 2005. Immunopathogenesis of psoriasis: recent insights on the role of adaptive and innate immunity. *J.Autoimmun.* 25 Suppl:69-73.
104. Arican, O., M. Aral, S. Sasmaz, and P. Ciragil. 2005. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators.Inflamm.* 2005:273-279.
105. Martinon, F. and J. Tschopp. 2004. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117:561-574.
106. Henley, D. V., C. J. Bellone, D. A. Williams, and M. F. Ruh. 2004. MAPK signaling pathways modulate IL-1beta expression in human keratinocytes. *Arch.Biochem.Biophys.* 424:112-118.
107. Hashimoto, S., K. Matsumoto, Y. Gon, S. Maruoka, I. Takeshita, S. Hayashi, T. Koura, K. Kujime, and T. Horie. 1999. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates IL-8 expression in human pulmonary vascular endothelial cells. *Eur Respir J* 13:1357-1364.
108. Ivaska, J., L. Nissinen, N. Immonen, J. E. Eriksson, V. M. Kahari, and J. Heino. 2002. Integrin {alpha}2{beta}1 Promotes Activation of Protein Phosphatase 2A and Dephosphorylation of Akt and Glycogen Synthase Kinase 3{beta}. *Mol.Cell.Biol.* 22:1352-1359.
109. Sanders, M. A. and M. D. Basson. 2000. Collagen IV-dependent ERK Activation in Human Caco-2 Intestinal Epithelial Cells Requires Focal Adhesion Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 275:38040-38047.
110. Zhu, W., J. S. Downey, J. Gu, F. Di Padova, H. Gram, and J. Han. 2000. Regulation of TNF Expression by Multiple Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *J Immunol* 164:6349-6358.
111. Johansen, C., K. Kragballe, M. Westergaard, J. Henningsen, K. Kristiansen, and L. Iversen. 2005. The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. *Br.J Dermatol* 152:37-42.