



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA MORFOLOGÍA,
INMUNOFENOTIPO Y CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN
DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES
PROVENIENTES DE PACIENTES CON PSORIASIS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

JESSICA MAYTE HERNÁNDEZ CRISTINO



DIRECTOR DE TESIS

DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

Ciudad de México, 2016



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de ser orgullosamente universitaria. Sangre azul y piel dorada.

Al Dr. Juan José Montesinos Montesinos, por todas sus recomendaciones y por permitirme realizar este hermoso trabajo en su laboratorio.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, por darme la oportunidad de conocer el maravilloso mundo de las células troncales.

A mis sinodales Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón, Dra. María de Lourdes Mora García y Dr. Edgar Ledesma Martínez por sus valiosos consejos para la realización de este trabajo.

A la Dra. Laura Bonifaz y al QFB. Octavio Castro Escamilla, porque sin su colaboración este trabajo nunca habría sido posible.

Al Dr. Fernando Candanedo González, por su enorme calidad humana, su ayuda y sus consejos.

A mis compañeras de laboratorio, Marti, Erika y sobre todo Marta, gracias por su cooperación y compañerismo.

A los pacientes con psoriasis, que tuve la fortuna de conocer al final de su largo viacrucis por encontrar un diagnóstico.

DEDICATORIAS.

A mis Padres, gracias por amarme, por trabajar cada día para hacer de mi vida la más feliz, por seguir creyendo en mí a pesar de todo. Este trabajo lo hicieron ustedes con su esfuerzo y dedicación, por cobijarme con su amor en mis momentos difíciles y por darme la libertad de soñar y seguir creciendo. Los amo profundamente y nada de lo que haga en esta vida será suficiente para agradecerles su amor y esfuerzo. Papi y Mami, gracias!

A Sussel y Fabiola, por ser las amigas que la vida me regaló, por ser un ejemplo de inteligencia, belleza, esfuerzo, trabajo, amor y valentía, por llenar mi vida de risas y hermosos momentos, porque a pesar del tiempo, la distancia o las circunstancias siempre estaremos juntas... y de pilón a mi hermano **Daniel**, por ser el más odioso pero el mejor hermano de todos.

A Rodrigo, Cristopher y Maximiliano, porque con su llegada llenaron de luz, felicidad, risas y amor mi vida. Porque son los más grandes amores de mi vida, porque admiro su brillo y belleza aun en los momentos de adversidad, su inteligencia ante cualquier situación y sus hermosas risas que cambian vidas. Estoy segura que se convertirán en grandes, hermosos y fuertes seres humanos. Los amo hoy y cada día de mi vida.

A Alfredo, por llegar a mi vida hace 18 años y ser mi mejor amigo en todo el planeta, por aparecer en los momentos correctos, por llenar mi vida de paz, por siempre ser paciente, inteligente, correcto, por siempre ver el lado bueno de las cosas, no importa qué tan negativo luzca el panorama, por emocionarme, hacerme feliz, amarme y centrarme. Por

regalarme 4 años de amor, los mejores 4 años de mi vida. Mi amor, In my life I love you more.

A la familia Rivera Pérez, por quererme y cuidarme, por tratarme como un integrante más de la familia.

A mis amigos de la universidad y de la vida, Damián y Miguel, por llenar mis años universitarios de risas, por apoyarme y aguantarme en mis momentos difíciles, por ser el mejor equipo, porque sin ustedes nada habría sido igual. Son, por mucho, los mejores de toda una generación.

A mis compañeros de laboratorio Oswa y Lups, por su amistad, su apoyo, porque siempre cuento con sus consejos y su tiempo. Oswa, gracias por ser un hermano para mí, el que ve las peores películas y el más necio, pero siempre es el más noble e inteligente. Los quiero mucho.

A mi amiga de toda la vida Ana, porque a pesar de los años seguimos siendo amigas, las mejores, como si el tiempo nunca hubiera pasado.

Índice	
Lista de abreviaturas.....	7
I. Resumen	9
II. Marco teórico.....	11
1. Piel	11
1.1 Epidermis	14
1.2 Dermis.....	17
2. Psoriasis	21
3. Biología de Células Troncales	27
4. Biología de las MSCs	31
5. MSCs e inmunosupresión	35
6. MSCs y Psoriasis.....	38
III. Planteamiento del problema	41
IV. Hipótesis	42
V. Objetivos.....	43
1. Objetivo general	43
2. Objetivos particulares.....	43
VI. Método	44
1. Obtención y cultivo de MSCs	44
2. Análisis morfológico.....	45
3. Inmunofenotipo	46
4. Capacidad de diferenciación.....	46
4.1. Inducción adipogénica	46
4.2. Inducción osteogénica	47

4.3. Inducción condrogénica.....	48
5. Análisis estadístico.....	48
VII. Resultados	49
1. Obtención de MSCs provenientes de pacientes con psoriasis e individuos sanos	49
2. Porcentaje de obtención de MSCs.....	50
3. Morfología de MSCs provenientes de pacientes con psoriasis e individuos sanos.....	51
4. Inmunofenotipo de MSCs provenientes de pacientes con psoriasis e individuos sanos.....	54
5. Capacidad de diferenciación de MSCs provenientes de pacientes con psoriasis e individuos sanos	57
5.1. Diferenciación adipogénica	57
5.2. Diferenciación osteogénica	58
5.3. Diferenciación condrogénica	60
VIII. Discusión de resultados	63
IX. Conclusiones	74
X. Perspectivas	75
XI. Bibliografía	77

LISTA DE ABREVIATURAS

CFU-F:	Colony Forming Units-Fibroblast
CTGF:	Connective Tissue Growth Factor
DCs:	Dendritic Cells
EGF:	Epidermal Growth Factor
ESCs:	Embryonic Stem Cells
FGF9:	Fibroblast Growth Factor
G-CSF:	Granulocyte-colony stimulating factor
HGF:	Hepatocyte Growth Factor
HO-1:	Heme Oxygenase 1
HSCs:	Hematopoietic Stem Cells
IDO:	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
IFN:	Interferon
IGF-1:	Insulin-like Growth Factor-1
IL:	Interleukin
iDCs:	immature Dendritic Cells
iNOS:	Inducible Nitric Oxide Synthase
HLA:	Human Leukocyte Antigen
KGF:	Keratinocyte Growth Factor
LIF:	Leukemia Inhibitory Factor
mDCs:	Myeloid Dendritic Cell
MSCs:	Mesenchymal Stem Cells

MSCs-DL:	Mesenchymal Stem Cells – Dermis Lesión
MSCs-DNL:	Mesenchymal Stem Cells – Dermis No Lesión
MSCs-DS:	Mesenchymal Stem Cells – Dermis Sano
MSCs-EL:	Mesenchymal Stem Cells – Epidermis Lesión
MSCs-ENL:	Mesenchymal Stem Cells – Epidermis No Lesión
MSCs-ES:	Mesenchymal Stem Cells – Epidermis Sano
NO:	Nitric Oxide
NK:	Natural Killer
PDCs:	Plasmacytoid Dendritic Cell
PDGF:	Platelet-Derived Growth Factor
PGE₂:	Prostaglandin E2
PSORS1:	Psoriasis Susceptibility 1
SCF:	Stem Cell Factor
TGF:	Transforming Growth Factor
TNF:	Tumor Necrosis Factor
T_H:	T Helper Cells
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor

I.RESUMEN

La psoriasis es una enfermedad crónica inflamatoria de la piel. Debido a que hay una desregulación inmunológica en los pacientes con psoriasis, se piensa que los componentes celulares que participan en dichos procesos inflamatorios serían los responsables del inicio y progresión de la patología. Se ha sugerido la presencia de las células troncales mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés *Mesenchymal Stem Cells*) en la dermis y epidermis de los pacientes con psoriasis, las cuales pueden ser un componente importante en el inicio, desarrollo y mantenimiento de la enfermedad, debido a sus propiedades inmunoregulatoras. A la fecha no se ha realizado un estudio que describa de manera fehaciente la presencia de MSCs y sus características morfológicas, inmunofenotípicas y de capacidad de diferenciación tanto en la dermis como en la epidermis de la piel de dichos pacientes.

En el presente estudio aislamos y caracterizamos MSCs de la dermis y epidermis de pacientes con psoriasis y de individuos sanos. Describimos de manera comparativa su morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos. Se procesaron 51 muestras de pacientes con psoriasis y 5 de individuos sanos. El porcentaje de obtención de MSCs fue del 100% en las muestras de dermis (DS) y epidermis (ES) de individuos sanos. En pacientes con psoriasis la obtención de MSCs en la dermis fue del 90% en muestras sin Lesión (DNL) y 95% con lesión (DL); mientras que en muestras de epidermis fue de 14% en aquellas sin lesión (ENL) y 75% con lesión (EL).

Al analizar la morfología de las MSCs encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células grandes y fibroblastoides, en los cultivos de MSC-DNL, MSC-DL y MSC-ENL, en comparación con MSCs de individuos sanos.

Las células fueron positivas para marcadores característicos de MSCs como CD73, CD90 y CD105 y negativas para la expresión de marcadores hematopoyéticos y de células endoteliales, así como para HLA-DR. De manera interesante, observamos que las MSC-DNL y MSC-DL, presentan una mayor expresión de HLA-ABC en comparación con individuos sanos. Observamos capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica en todas las MSCs analizadas.

Nuestros resultados indican la presencia de MSCs tanto en la dermis como en la epidermis de pacientes con psoriasis. Estas células presentan algunas características biológicas diferentes a las MSCs provenientes de individuos sanos, en particular respecto a la expresión de HLA-ABC, lo cual podría repercutir en la activación de la respuesta inmune y por tanto en la inflamación crónica. La participación de las MSCs en el contexto del desarrollo de la patología, está por determinarse.

II. MARCO TEORICO

1. LA PIEL

La piel es una estructura que protege al huésped de su ambiente y al mismo tiempo, permite la interacción del organismo con el entorno circundante. Este órgano es una estructura dinámica y compleja, ya que está compuesta por diversos tejidos y una variedad de estructuras accesorias, como folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, receptores sensoriales, pelo y uñas (Figura 1). La función primaria de la piel es impedir la excesiva pérdida de agua, sirviendo como una barrera permeable. Por otro lado, la piel es el primer órgano de defensa contra agentes externos, proporcionando protección contra daños mecánicos, químicos, térmicos, solares, además de infecciones por microorganismos (Visscher *et al*, 2014; Forni *et al*, 2012).

La piel se compone de dos capas principales con funciones estructurales y fisiológicas únicas: dermis y epidermis; además, también consta de la hipodermis, considerada como una capa que aísla la piel de los órganos internos. La epidermis (capa exterior), tiene un grosor de entre 0.06mm a 1mm y es un epitelio escamoso estratificado compuesto principalmente por queratinocitos. La epidermis se enfrenta directamente al medio ambiente incluyendo radiación UV, agentes patógenos y tóxicos, funcionando principalmente como barrera aislante (Forni *et al*, 2012; Mohd *et al*, 2015; Park, 2015).

Por otro lado, la dermis tiene un grosor de 1mm a 2mm y se separa de la epidermis por una membrana epidermal. La dermis es considerada como un sistema de soporte, el cual, está compuesto de matriz extracelular, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, terminaciones nerviosas, folículos pilosos, glándulas, sudoríparas y una gran variedad de

poblaciones celulares que son necesarias, no solo para el mantenimiento estructural de la piel sino también para importantes funciones biológicas (Figura 1) (Forni *et al*, 2012; Mohd *et al*, 2015; Park, 2015).

Finalmente, la hipodermis, que no es considerada parte de la piel, se encuentra debajo de la dermis y es equivalente a la fascia subcutánea. Compuesta por tejido adiposo dispuesto en lóbulos, el cual se moldea para los músculos y huesos subyacentes de la piel, brinda aislamiento e integridad mecánica (Forni *et al*, 2012; Mohd *et al*, 2015; Park, 2015).

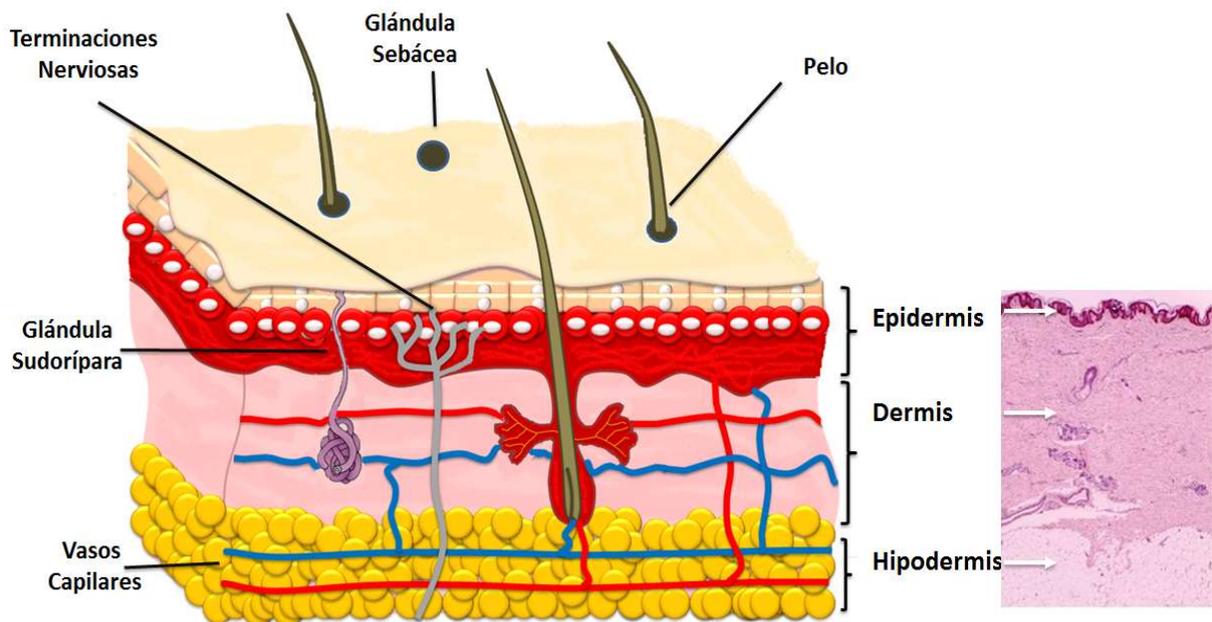


Figura 1. Diagrama esquemático de la estructura de la piel. La piel está compuesta por tres capas principales, la capa externa se llama epidermis, que es la barrera principal de permeabilidad, con funciones inmunitarias, de adhesión y protección contra la radiación ultravioleta. La capa media de la piel se llama dermis, elemento estructural principal. Esta capa es más gruesa y contiene vasos sanguíneos, nervios y glándulas sudoríparas. El vello de la piel crece en la dermis, que también produce el sudor y aceites que evitan que la piel se reseque. Por último, se encuentra la Hipodermis que es la fuente más grande de vasos sanguíneos y nervios, compuesta principalmente por adipocitos, provee aislamiento e integridad mecánica (Modificada de Fitzpatrick, 2009).

1.1 EPIDERMIS

Como un epitelio estratificado, la epidermis consta de varias capas, cada una con sus propias características (Figura 2), diseñadas para proporcionar protección contra el medio ambiente. Aunque la principal célula presente en la epidermis es el queratinocito, también podemos encontrar melanocitos (productores de melanina, el pigmento de la piel) y células de Langerhans, las cuales son las principales células inmunes de la piel. Además, las células T CD8⁺ se pueden encontrar en el estrato basal y el estrato corneo (Figura 3) (Forni *et al*, 2012; Nestle *et al*, 2009).

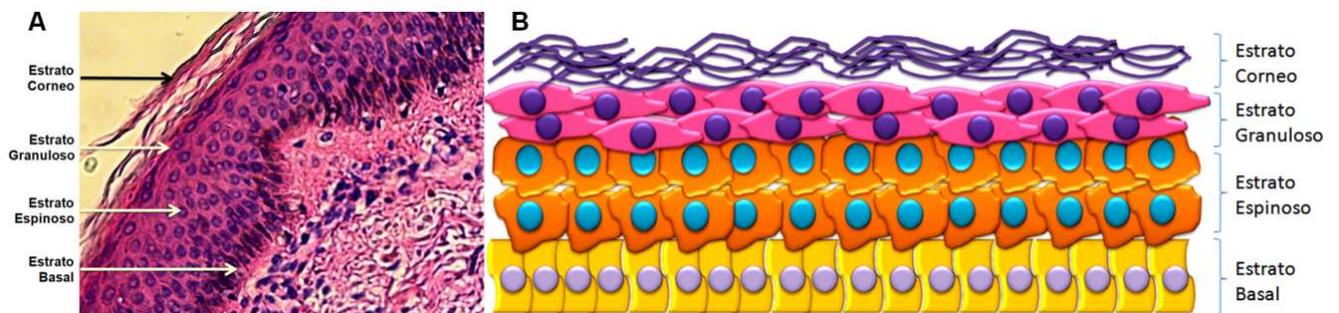


Figura 2. Tinción y esquema de la Epidermis. A) Tinción de corte histológico de piel en el cual se pueden apreciar claramente las 4 diferentes capas que componen la Epidermis. B) Representación esquemática de los 4 estratos que componen la Epidermis y la transición maduración de la capa Basal, la cual da lugar al estrato Espinoso, Granuloso y Corneo, siendo ésta la capa que se encuentra expuesta al medio ambiente (Modificada de Nestle *et al*, 2009).

La capa más profunda de la epidermis, la capa basal, contiene células indiferenciadas y proliferativas que se someten a una división regulada, las cuales realizan dos funciones principales, la adherencia de la epidermis a la dermis subyacente a través de la membrana basal y una fracción de estas células se diferencian para formar las capas consiguientes y reemplazar las células desprendidas por la capa cornea. Para llevar a cabo

estas funciones y mantener la homeostasis epidérmica, las células deben mantener un estricto equilibrio entre quiescencia y proliferación (Figura 2) (Forni *et al*, 2012; Scharadinet *et al*, 2014).

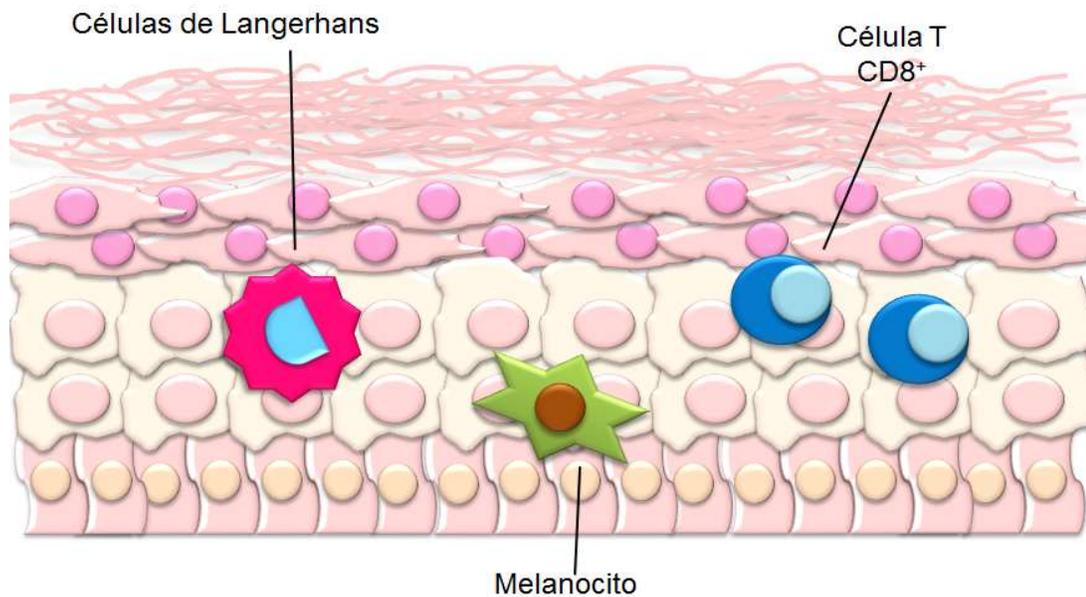


Figura 3. Anatomía de la epidermis y poblaciones celulares. Las células especializadas en la epidermis incluyen melanocitos, células de Langerhans y linfocitos T CD8+ citotóxicos (Modificada de Nestle *et al*, 2009).

Las células de la capa basal tienen potencial proliferativo, pero las células de la capa espinosa y granulosa, aunque viables, no proliferan. Este cambio en el estado de diferenciación se asocia con cambios en la expresión de proteínas. Las principales proteínas estructurales dentro de los queratinocitos basales son las queratinas 5 y 14, las cuales, por mucho tiempo, han sido conocidas como sello distintivo de poblaciones que presentan potencial proliferativo en este tejido. Después del compromiso de diferenciación, ciertos queratinocitos migran de la capa basal a la suprabasal, también

conocida como capa espinosa. Al llegar a esta capa, las células pierden progresivamente su potencial proliferativo y comienzan a sintetizar un conjunto de proteínas y enzimas estructurales asociadas con el montaje de la envoltura cornea, también, comienzan a expresar marcadores de diferenciación, tales como transglutaminasa tipo 1, involucrina, loricrina, filagrina, queratina 1 y queratina 10 (Forni *et al*, 2012; Hsu *et al*, 2014; Scharadin *et al*, 2014).

La siguiente capa, llamada granular, se compone de células que tienen granos intracelulares unidos a la membrana, que contienen proteínas y lípidos requeridos para la formación de la barrera epidérmica como queratohialina que induce el colapso de la célula en forma aplanada, además, esta proteína se utiliza como andamio en el siguiente estrato, la capa cornea, para su plena maduración, la cual implica la pérdida de núcleo y el montaje de la cubierta cornea. Estas células completamente diferenciadas son llamadas corneocitos, que consisten en una red de queratina estabilizada rodeada por una envoltura covalente reticulada de proteínas (Forni *et al*, 2012; Scharadin *et al*, 2014).

1.2 DERMIS

Situado entre la epidermis y la hipodermis, la dermis es un tejido conectivo que actúa como soporte y protección de la epidermis que cuenta con una histología sencilla, pero la dermis subyacente es anatómicamente más complicada, ya que cuenta con una mayor diversidad celular (Forni *et al*, 2012; Nestlé *et al*, 2009).

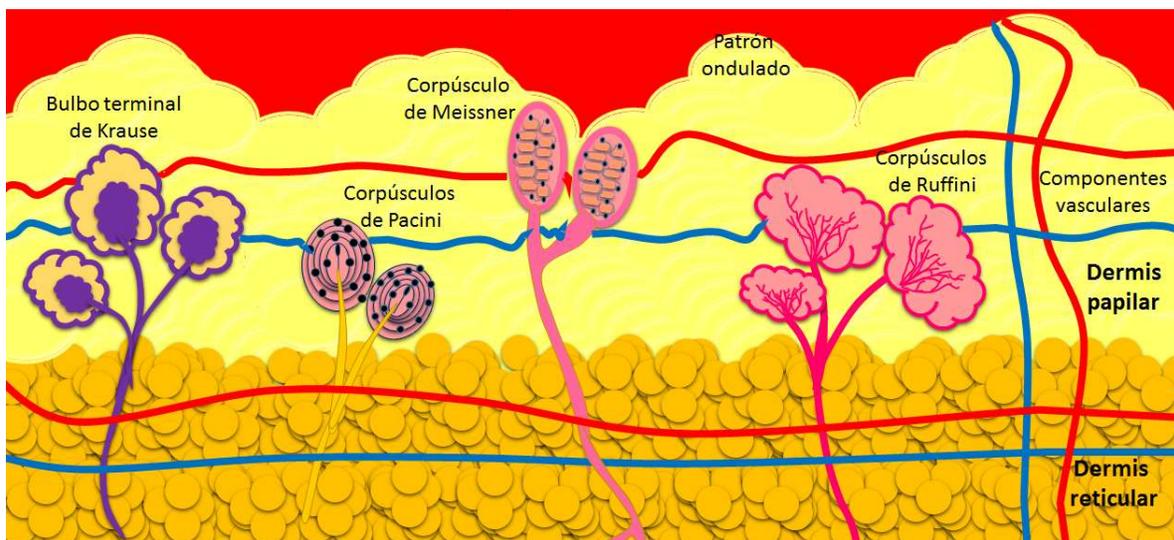


Figura 4. Representación esquemática de los estratos y componentes estructurales, que componen la dermis. La unión entre la epidermis y la dermis tiene un contorno muy irregular con evaginaciones digitiformes de tejido conectivo, llamadas papilas dérmicas. También, la piel está dotada de receptores sensoriales de diversos tipos y particularmente en la dermis, podemos encontrar estructuras nerviosas, las cuales se encuentran en una capsula de tejido conectivo, como son: bulbo terminal de Krause, corpúsculo de Pacini, corpúsculo de Meissner y corpúsculo de Ruffini (Modificada de Fitzpatrick, 2009).

Entre las capas dérmicas encontramos la dermis papilar, que se encuentra en contacto con la epidermis y dermis reticular, que separa a la dermis de la hipodermis. Estos estratos difieren mucho en su composición y estructura, ya que el primero contiene fibras de colágeno, compuestas principalmente de colágeno en paquetes sueltos desorganizados, mientras que la dermis reticular cuenta con fibras de colágeno más

compactas que tienden a ser paralelas a la superficie de la piel y fibras elásticas gruesas. El límite entre la dermis y la epidermis muestra un patrón ondulado debido a la presencia de papilas dérmicas, que empuja la parte profunda de la epidermis. En sitios donde la tensión mecánica a la que está sometida la piel es mayor, las papilas dérmicas son mucho más largas y están más juntas, lo que crea una interfaz más extensa entre la dermis y la epidermis. También, la dermis está compuesta por corpúsculos táctiles y componentes vasculares que le confieren a la piel un grado de especialización sensorial sofisticado (Figura 4) (Forni *et al*, 2012; Ross *et al*, 2007; Tay *et al*, 2014).

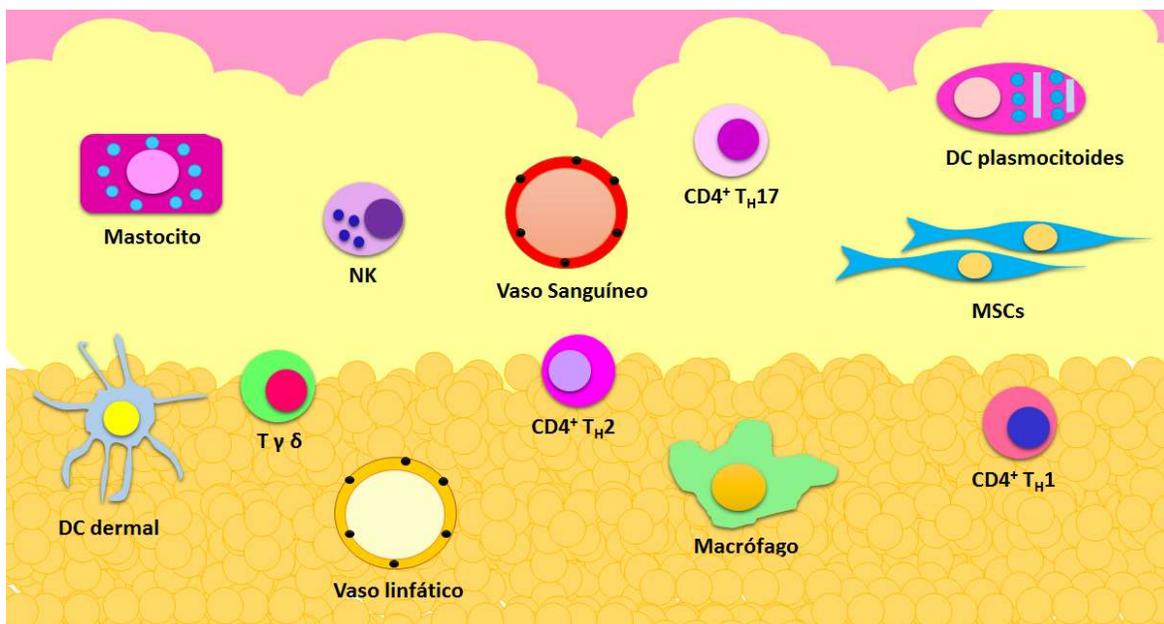


Figura 5. Anatomía de la dermis y poblaciones celulares. La dermis contiene muchas células especializadas como células dendríticas y linfocitos T. Además, macrófagos, mastocitos. Se sugiere que las MSCs también están presentes en ésta capa (Modificada de Nestle *et al*, 2009).

La dermis, además, contiene diversas poblaciones celulares, embebidas en una matriz extracelular compuesta principalmente por fibras de colágeno y elastina (Figura 5). Estas células no solo aseguran la protección contra agentes patógenos manteniendo al mismo tiempo, la tolerancia a antígenos inocuos, sino también contribuyen a la patología de un número de enfermedades inflamatorias de la piel. Esta red inmune está compuesta principalmente por células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés *Dendritic Cells*) las cuales representan una subpoblación de células presentadoras de antígenos que se definen, en gran medida, por su capacidad para presentar antígenos a las células T naïve, tanto para la generación de inmunidad contra patógenos invasores, así como la tolerancia a antígenos propios y bacterias comensales. Esta función requiere la capacidad de migrar a través de los vasos linfáticos de drenaje de la piel a los ganglios linfáticos, donde se inician y dan forma a la respuesta inmune adaptativa (Forni *et al*, 2012; Tay *et al*, 2014)

Otra población presente en la dermis son las células CD4⁺ T cooperadoras (T_H, por sus siglas en inglés *T Helper Cells*) que son esenciales para la defensa de diversas infecciones fúngicas y bacterianas. También podemos encontrar células T γ δ , que constituyen una pequeña porción del total de células T en la dermis (2% - 9%), de las cuales, se sabe poco acerca del papel que juegan en la piel pero se ha demostrado que producen factores de crecimiento relacionados con la cicatrización de las heridas, tales como el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF, por sus siglas en inglés *Connective Tissue Growth Factor*), factor de crecimiento de fibroblastos 9, (FGF9, por sus siglas en inglés *Fibroblast Growth Factor 9*), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF, por sus siglas en inglés *Keratinocyte Growth Factor*) y factor de crecimiento insulínico tipo

1 (IGF-1, por sus siglas en inglés *Insulin-like Growth Factor 1*). Además, podrían contribuir en la defensa antimicrobiana mediante la producción de ciertos péptidos antimicrobiales como catelicidinas (Nestlé *et al*, 2009).

En la dermis igualmente residen otras poblaciones celulares como son las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés *Natural Killer*) que son un vínculo importante entre la inmunidad innata y adaptativa debido a su capacidad para reconocer glicolípidos bacterianos y por lo tanto, servir como centinelas inmunes antimicrobianos matando así células infectadas o aberrantes. Asimismo, es posible encontrar macrófagos que representan una población clave, que no solo combate organismos invasores y daño tisular, sino también realizan funciones de desarrollo y homeostasis. Los mastocitos, que se encuentran en las proximidades de los vasos sanguíneos de la dermis, además de su papel como efectores de la respuesta inmune T_H2 , se ha propuesto que participan en la defensa de patógenos, la respuesta de hipersensibilidad al contacto y la curación de heridas, durante la cual se realizan funciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias en la herida. Se ha sugerido que la dermis cuenta con una población que podría jugar un papel clave en la curación, cicatrización de heridas en la piel, así como inicio, regeneración, desarrollo y mantenimiento de enfermedades de la misma: las células troncales mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés *Mesenchymal Stem Cells*). La dermis es drenada por los conductos linfáticos y vasculares, a través de los cuales todas estas células pueden migrar (Dunphy *et al*, 2011; Nestlé *et al*, 2009; Tay *et al*, 2014).

2. PSORIASIS

La psoriasis es una enfermedad crónica inflamatoria recurrente de la piel. Su prevalencia varía entre los grupos étnicos, pero afecta del 1-3% de la población de los países industrializados. Su curso clínico puede variar mucho en términos de morfología, distribución y gravedad de la enfermedad. El subtipo más común que representa el 90% de los casos es la psoriasis en placa, que se caracteriza por la formación de placas de color rosa, papuloescamosas, bien delimitadas a partir de la piel normal circundante, cubiertas por escamas blancas o plateadas y pueden ser gruesas, finas, grandes o pequeñas. El 9% de los pacientes puede presentar psoriasis en gota y su nombre se lo da el tipo de lesiones que se manifiestan en el paciente, las cuales tienen forma de pequeñas gotas rojas, irritadas y dispersas. Esta forma de psoriasis puede convertirse en placa, también llamada vulgar. Otro tipo menos frecuente de la enfermedad es la psoriasis pustulosa, la cual se presentan en forma de heridas pequeñas, plateadas, llenas de pus y enrojecimiento de la piel (McDonald *et al*, 2012; Dunphyet *al*, 2011).

La psoriasis afecta a hombres y mujeres por igual y se ve en todas las razas. Aunque se presenta a cualquier edad, se puede diferenciar en dos subgrupos, el tipo 1, que ocurre con mayor frecuencia entre las edades de 15 y 20 años y el tipo 2 que comienza entre los 50 y 69 años. La psoriasis tipo 1, se presenta en el 75% de todos los pacientes con psoriasis y se asocia con un curso más grave de la enfermedad (McDonald, *et al*. 2012; Sabat, *et al*. 2007).

La psoriasis da lugar a la hiperproliferación de queratinocitos, los cuales, se diferencian y llegan a su madurez en el estrato corneo de la piel en tan solo 5 días, en comparación con aproximadamente los 30 días que tardan en llegar en una piel sana, además, se observa una formación anormal de células de la capa cornea causada por la persistencia de los núcleos, dando como resultado el engrosamiento de la epidermis. La capa granular de la epidermis se reduce, se presenta una marcada angiogénesis e infiltración de células inmunes de la piel (Roberson *et al*, 2010; McDonald *et al*, 2012; Dunphy *et al*, 2011).

Varios cambios histológicos, que definen la enfermedad, pueden ser observados claramente. Estos incluyen: (1) epidermis engrosada, que surgen de la rápida proliferación de queratinocitos; (2) capa granular reducida (hipogranulosis) y retención de los núcleos en las células de la capa cornea; (3) dilatación de los vasos sanguíneos de la dermis papilar provoca eritema visible y (4) un infiltrado inflamatorio denso compuesto por grupos de células CD4⁺ T_H, DC, CD8⁺ T y neutrófilos en la epidermis (Figura 6) (Nogales *et al*, 2010).

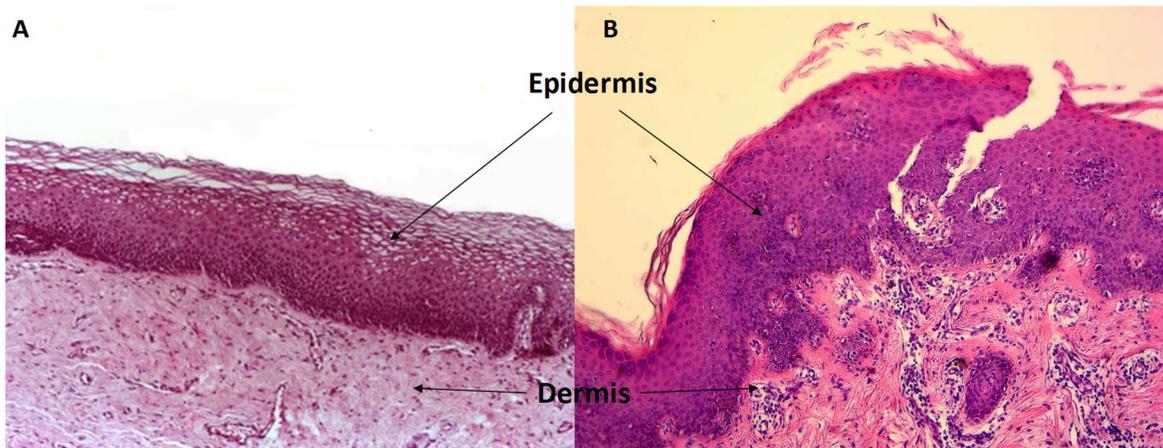


Figura 6. Corte histológico y tinción: piel sana y piel con psoriasis. A) Tinción de corte histológico de piel, en el cual, se pueden apreciar que no hay alteraciones en las capas. B) Corte histológico de piel proveniente de paciente con psoriasis. Se puede observar, claramente, que la epidermis presenta acantosis, inflamación y hay infiltración celular con retención de células en el estrato corneo.

El inicio de la formación de la lesión aun es poco conocido, pero se cree que ocurre cuando un disparador (trauma físico, producto bacteriano, estrés celular) hace que el ADN se altere y comience la proliferación descontrolada de queratinocitos. El ADN forma un complejo con el péptido antimicrobiano LL-37, expresado por los queratinocitos como respuesta al daño o infección y activa a las DC plasmacitoides (PDCs, por sus siglas en inglés *Plasmacytoid Dendritic Cells*) vía el receptor 9 tipo toll. Activadas las PDCs, liberan interferón tipo I, que a su vez activa a las células dendríticas mieloides (mDCs, por sus siglas en inglés *Myeloid Dendritic Cells*). Las mDCs liberan interleucina 20 (IL-20, por sus siglas en inglés *Interleukin 20*) a nivel local, lo cual acelera la proliferación de queratinocitos. Del mismo modo, un subconjunto de mDCs deja la dermis y migra hacia los nodos linfáticos locales, donde libera IL-23 y activa las células T naive. Células TH1 y TH17 son reclutadas en la lesión y comienzan a producir numerosas citocinas, incluyendo el Interferón Gamma (IFN- γ), IL-17 e IL-22. En este medio, con estas citocinas, aumenta la

proliferación de queratinocitos y causa que estos secreten proteínas antimicrobianas (LL-37), quimiocinas y proteína S100. Estos factores solubles tienen tres funciones: estimulación de células DC y liberación de más IL-23, reclutamiento de neutrófilos en la epidermis y la activación de fibroblastos dérmicos. Este ciclo de queratinocitos activando DC, DC activando células T y células T activando queratinocitos, parece ser la razón del mantenimiento de la lesión (Figura 7) (Villaseñor *et al*, 2012).

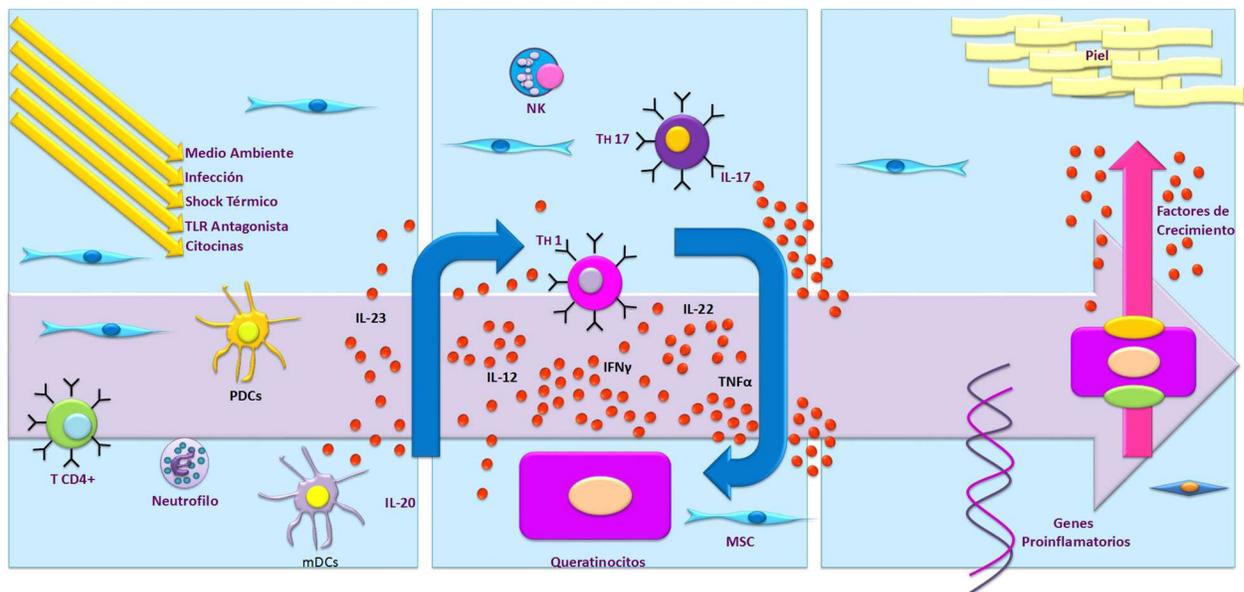


Figura 7. Inicio y desarrollo de la psoriasis. Aún no está claro el disparador de la enfermedad, pero se cree que varias células y factores químicos están involucrados (Modificado de Villaseñor *et al*, 2012).

En los últimos años, se han realizado importantes avances en nuestra comprensión acerca de la genética y los mecanismos patogénicos de la psoriasis, pero el debate continúa acerca de si la psoriasis es un trastorno autoinmune. La búsqueda de la participación de genes específicos en la psoriasis comenzó aproximadamente hace una década con los estudios de vinculación genética. Sin embargo, después de varios estudios

grandes de vinculación con el genoma, se ha confirmado, de modo consistente, la existencia de solo un locus, que confiere Susceptibilidad a la Psoriasis (PSORS1, por sus siglas en inglés *Psoriasis Susceptibility 1*). Esta localizado en el complejo mayor de histocompatibilidad, donde residen los genes de los antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés *Human Leukocyte Antigen*). Análisis recientes confirman los hallazgos de que la asociación genética más fuerte para la psoriasis se encuentra dentro de la región HLA (HLA-Cw6, HLA-B13, HLA-B17, HLA-Bw57 y HLA-DR4). Las personas con HLA-Cw6, por ejemplo, tienen 10 veces más probabilidades de presentar la enfermedad y se asoció con la psoriasis tipo 1, caracterizada por la edad temprana de inicio, siendo más probable que sea hereditaria y con un curso clínico severo. Curiosamente, algunos genes de esta región se asocian también con otras enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, colitis y diabetes (Nogales *et al*, 2010; Fitzpatrick *et al*, 2009; Griffiths, 2007).

Hay una idea creciente de que la psoriasis es más que una enfermedad en la superficie de la piel, la cual, tiene manifestaciones sistémicas importantes que se comparten con otras enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide y enfermedades cardiovasculares, siendo estas las que ponen en peligro la vida del paciente. Estudios recientes revelan un escenario de cómo se desarrolla la enfermedad a partir de los genes: los factores genéticos manejan el proceso específico de la enfermedad (paso 1); posiblemente se desencadena por factores ambientales, que involucran la respuesta inmune innata y adaptativa (paso 2); se desarrolla la enfermedad (paso 3) y finalmente se genera comorbilidad, probablemente resultado de la inflamación crónica (paso 4). De acuerdo con la hipótesis, la psoriasis severa es un trastorno

inflamatorio crónico sistémico. Se aumenta la carga inflamatoria del paciente y provoca un estado de resistencia a la insulina, resultando en una disfunción de las células endoteliales y el desarrollo de aterosclerosis. En el nivel de las arterias coronarias, carótida o cerebral, esta cascada se traducirá en el infarto de miocardio o accidente cerebrovascular (Boehncke *et al*, 2011).

3. BIOLOGÍA DE LAS CELULAS TRONCALES

Desde los primeros años del siglo XX, médicos y científicos de diversos países buscaron descifrar los secretos del origen de las células sanguíneas. En esa época, la terminología *célula troncal* se comenzó a usar, con el científico y darwinista alemán Ernst Haeckel, que, fusionando los conceptos de filogenia y ontogenia, describió la *stammzelle*, un concepto evolutivo de una célula primordial que se desarrolla en todas las células y los organismos multicelulares. El argumento de Haeckel fue dado a partir de sus observaciones del desarrollo del embrión y la distinción entre los huevos fertilizados y los no fertilizados. Otros investigadores, como los grandes patólogos de la época Sabian, Ferrata y Maximow, propusieron la existencia de una célula precursora común para los eritrocitos, leucocitos y trombocitos, a la que se le denominó *hemocitoblasto*, sin embargo, no había prueba alguna de que esta célula realmente existiera.

Fue hasta febrero de 1961, cuando la revista *Radiation Research* publicó un artículo que demostraría sin lugar a dudas, la existencia de dicha célula precursora. Los autores del trabajo fueron Ernest McCulloch y su alumno de posgrado, James Till. Este artículo describía una serie de experimentos encaminados a demostrar la presencia, en medula ósea (MO) de ratones, de células hematopoyéticas muy inmaduras, capaces de reconstituir el sistema hematopoyético de ratones que habían sido previamente irradiados. Till y McCulloch encontraron que la frecuencia de estas células era muy baja, que tenían capacidad de autorreplicarse y eran multipotenciales. Estas tres características constituyeron la base funcional para definir a las células troncales del sistema hematopoyético (Brunt *et al*, 2012; Mayani, 2011; Till *et al*, 1961).

Las células trocales se identificaron por primera vez en el sistema hematopoyético de ratones, sin embargo, a lo largo de los años, se ha demostrado su presencia en muchos otros tejidos, como la epidermis, el músculo, el hígado y hasta el cerebro. Con el tiempo, se vio que tanto las células formadoras de los tejidos somáticos e incluso el cigoto, comparten diversas características biológicas (a nivel genético, celular y molecular) y este hecho ha permitido que se les reconozca como miembros de una misma familia, la familia de las células troncales (Pelayo *et al*, 2011).

Las células troncales son células inmaduras, no diferenciadas, con una alta capacidad de auto replicación y pueden diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo (Figura 8). A lo largo del desarrollo se generan diversos tipos de células troncales. La primera célula troncal es el huevo fertilizado, o cigoto, la cual es una célula troncal totipotencial, capaz de producir tanto al embrión, como a las estructuras que formaran parte de él. Conforme avanza el desarrollo, el embrión alcanza el estadio de blastocisto. Las células troncales embrionarias (ESCs, por sus siglas en inglés *Embryonic Stem Cells*), que se derivan de la masa celular interna del blastocisto, se consideran pluripotenciales y pueden diferenciarse en células de las tres capas germinales (Figura 9). Sin embargo, la controversia ética obstaculiza su investigación y aplicación clínica (Pelayo *et al*, 2011; Mayani, 2003).

A partir de ESCs se producen diferentes células troncales somáticas, incluyendo aquellas que dan origen al sistema nervioso central, a los nervios periféricos, la sangre, el hígado, el páncreas, los músculos, los huesos, la piel, el corazón, entre otros. Dichas células troncales son consideradas multipotenciales, ya que pueden generar diversos

linajes celulares dentro del mismo tejido. Profundizar en la caracterización de esas células ha sido difícil debido al hecho de que su frecuencia en diferentes tejidos del cuerpo es extremadamente baja y además, su identificación no se basa en su morfología, pero si en su inmunofenotipo y funcionalidad. Cabe mencionar que las ESCs producen también un tipo diferente de células troncales no somáticas: las células troncales germinales, las cuales migran a las gónadas en el desarrollo y eventualmente dan lugar a los gametos (Pelayo *et al*, 2011; Mayani, 2003).

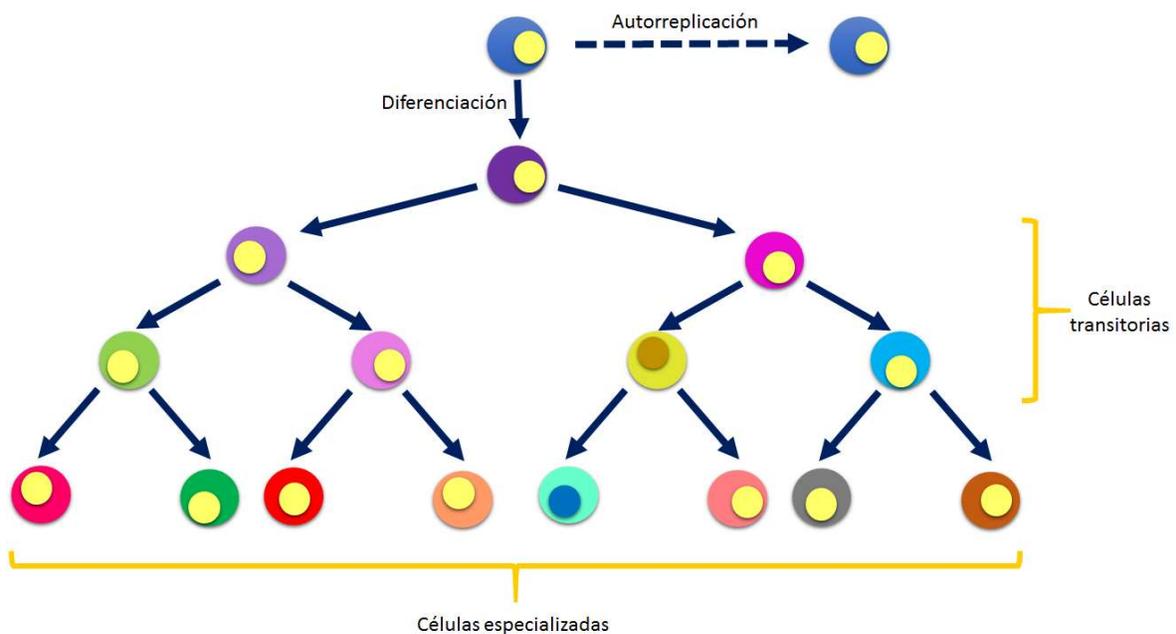


Figura 8. Definición funcional de la célula troncal. Las células troncales se han definido como células inmaduras, no diferenciadas, que tienen la capacidad de diferenciarse simétrica y asimétricamente, dando lugar tanto a una célula troncal (autorreplicación) como a una progenitora (diferenciación). Entre las células troncales y las células maduras existen poblaciones de células transitorias que permiten la amplificación del número de células maduras (Tomado de Pelayo *et al*, 2011).

Dentro del grupo de las células troncales, aquellas que se localizan en la MO son de dos tipos: Las células troncales hematopoyéticas (HSCs, por sus siglas en inglés

Hematopoietic Stem Cells) y MSCs. Las HSCs han sido las más estudiadas y en la actualidad se tiene un panorama bastante claro acerca de su estructura y biología (Flores *et al*, 2006).

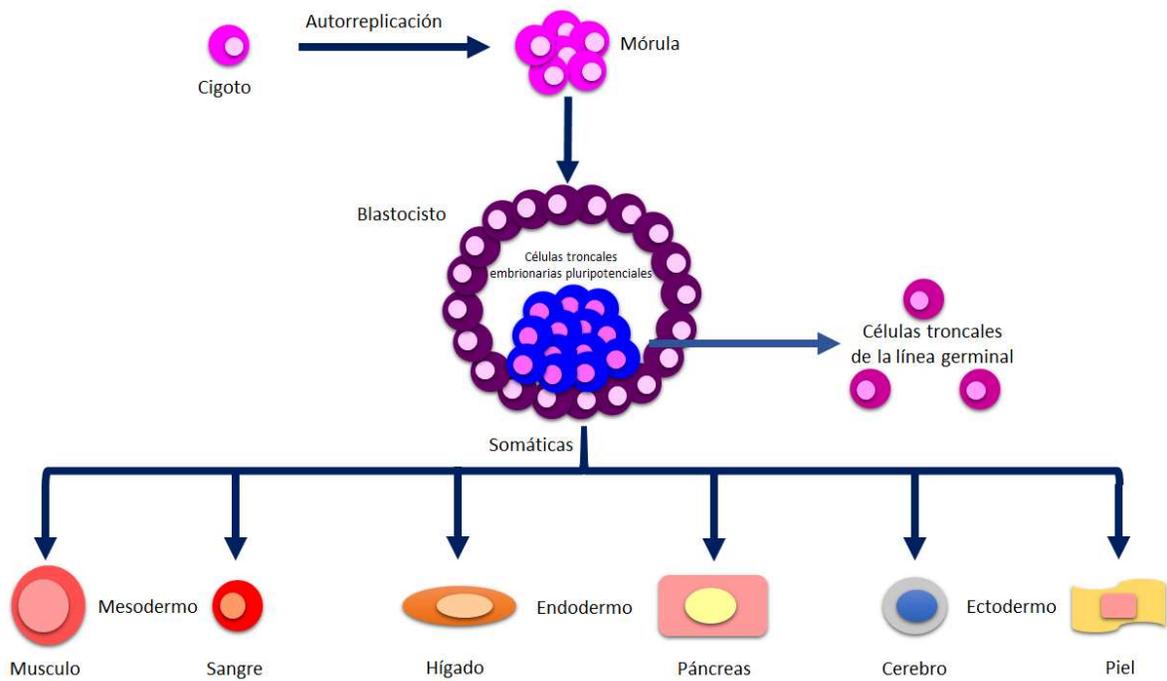


Figura 9. Células troncales durante el desarrollo prenatal en mamíferos. El cigoto es una célula troncal totipotencial. Al autorreplicarse genera varias células idénticas a ella, las cuales constituyen el estadio de mórula. En el estadio de blastocisto, las células de la masa celular interna corresponden a células troncales embrionarias pluripotenciales. Dichas células troncales embrionarias dan lugar a células troncales de la línea germinal, o bien, a células troncales somáticas de las tres capas embrionarias (Tomada de Pelayo, *et al*. 2011).

4. BIOLOGÍA DE LAS MSCs

Particularmente, el estudio de las MSCs comenzó a finales de los años 60's y se extendió durante la década de los 70's. Con los trabajos de Friedenstein, se observó que MO es una fuente de MSCs en los tejidos durante la vida postnatal; se obtuvieron muestras de MO de la cresta iliaca y se sembró la suspensión en placas de cultivo. Al retirar la parte hematopoyética se pudo observar una población adherida al plástico, células de tipo fibroblastoide que tenían la capacidad de dar lugar a diferentes tipos celulares, como fibroblastos medulares o células reticulares, adipocitos, condrocitos y osteoblastos. A estas células se les llamó mecanocitos estromales o unidades formadoras de colonias de fibroblastos (*CFU-F*, por sus siglas en inglés *Colony Forming Units-Fibroblast*). Éstas, posteriormente, fueron llamadas MSCs por su capacidad de diferenciarse a células de origen mesodérmico (Flores *et al*, 2006; Wong, 2011).

En la década de los 80's, diversos grupos de investigación se dieron a la tarea de caracterizar a la población celular de MO, capaz de originar el estroma medular, hueso y cartílago. En específico, Friedenstein y su grupo de trabajo, encontraron que las colonias de morfología fibroblastoide, provenientes de MO, derivan de un solo progenitor; también demostraron su gran capacidad proliferativa, su habilidad para autorenovarse y su multipotencialidad. En la década de los 90's, fue demostrado que las MSCs tiene la capacidad de diferenciarse hacia un fenotipo miogénico y Pittenger junto con su equipo de trabajo, demostraron que las MSCs de un individuo adulto son capaces de ser expandidas y formar colonias sin perder su potencial multilínea. Igualmente, Kopen describió la capacidad de las MSCs para transdiferenciarse hacia tejido ectodermal (Williams *et al*,

2011; Flores *et al*, 2006). También, en esta década, Owen y su grupo de trabajo demostraron que estas células tienen la capacidad de originar tejido óseo, cartilaginoso y conjuntivo a partir de una pequeña cantidad de células. Ensayos *in vivo* de CFU-F, demostraron que tienen una alta capacidad de autorenovación y multipotencialidad, además, mostró la presencia de MSCs en la mayoría de los modelos animales y humanos. A partir de entonces, Caplan y colaboradores en 1994, les designa el nombre de “Células Troncales Mesenquimales”. En el año 2000, Sánchez-Ramos demostró que las células estromales de MO adulta, tanto de humanos como de ratones, podían ser inducidas *in vitro* a diferenciarse en células neuronales encontrando que las MSCs indiferenciadas expresan marcadores característicos de células neuronales (Flores *et al*, 2006; Owen *et al*, 1988; Sánchez-Ramos *et al*, 2000).

Estudios *in vitro* demostraron que las MSCs en co-cultivos con miocitos ventriculares y cardiomiocitos inducen transdiferenciación hacia fenotipo cardiomiocito. Igualmente, se demostró que las MSCs tienen la capacidad de suprimir la proliferación de linfocitos T, lo que favoreció la aplicación de las MSCs en trasplantes alogénicos y como terapia inmunomoduladora potencial. Las MSCs, fueron aisladas por primera vez de MO y luego de otros tejidos. *In vivo*, éstas células son poco frecuentes y la mayoría de las investigaciones, por lo tanto, se basan en los resultados obtenidos con aquellas derivadas de la MO, cultivadas *ex vivo*. Otra característica importante de las MSCs es que no hay un marcador de superficie celular único que distinga inequívocamente a las MSCs de otro tipo de células, lo que hace difícil una definición uniforme (Williams *et al*, 2011; Le Blanc *et al*, 2012).

Investigadores reportan estudios de MSCs usando diferentes métodos de aislamiento, expansión y enfoques para caracterizar estas células. Así, es cada vez más difícil comparar y contrastar los resultados, esto obstaculiza el progreso en el conocimiento de estas células. Por lo tanto, *The International Society for Cellular Therapy* (ISCT) propuso los siguientes criterios para definir a las MSCs de humano (Dominici *et al*, 2006):

- ✓ En primer lugar, las MSCs deben de ser adherentes al plástico, cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar.
- ✓ Diversos trabajos concuerdan en que las MSCs no expresan los antígenos de células hematopoyéticas como CD11b, CD14, CD31, CD34, CD43, CD45, CD56, CD68 y CD133; siendo positivos únicamente para el marcador de células hematopoyéticas CD90. También son positivas al marcado CD105 (endoglina) y al marcador CD73. Así, 95% de la población de MSCs debe expresar CD105, CD73 y CD90 mediante citometría de flujo. Adicionalmente, estas células deben presentar la expresión negativa de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA clase II.
- ✓ Las MSCs, son células pluripotentes que se diferencian a diversos linajes. Las células deben ser capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos conforme a la norma de condiciones de diferenciación *in vitro*.

En los primeros estudios sobre las MSCs se creía que únicamente eran capaces de generar células de origen mesodérmico, sin embargo, en el transcurso de los primeros

años del siglo XXI, esta idea cambio ya que se ha publicado que son capaces de diferenciarse a una variedad de linajes celulares incluyendo osteoblastos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos, mioblastos, cardiomiocitos, hepatocitos, tenocitos, epitelio, células del pulmón, intestino, bazo e incluso neuronas; por lo tanto las MSCs pueden diferenciarse no solamente en células del mesodermo, sino también pueden adoptar un destino endodermal o ectodermal, los que se denomina como plasticidad celular (Flores *et al*, 2006; Teven *et al*, 2011).

5. MSCs E INMUNOSUPRESIÓN

Es importante el interés que se ha generado en las MSCs para su uso en el trasplante, que fue fomentado cuando se descubrió que poseen propiedades supresoras de células del sistema inmune. Son susceptibles a la actividad supresora de las MSCs las células NK, células B activadas, células T CD4⁺ y CD8⁺. También, las MSCs obstaculizan la maduración de las DCs, a través de la baja regulación de moléculas del MHC de clase II y moléculas co-estimuladoras. Además de sus efectos inmunosupresores, también tienen propiedades de inmunosoprote, que retrasa la apoptosis de los neutrofilos y preservación de los mismos logrando así que estos se encuentren más fácilmente disponibles para las infecciones (Engela *et al*, 2012). Uno de sus efectos inmunomoduladores sobre las células inmunes es detener su ciclo en G0 y G1. Más aún, se ha encontrado que son capaces de inducir a las células T a diferenciarse a un fenotipo T-reg. Las MSCs inhiben a las células NK y la producción de IFN- γ , al secretar mediadores solubles incluyendo Indolamina-2, 3-Dioxigenasa (IDO, por sus siglas en inglés *Indoleamine 2,3-Dioxygenase*), Prostaglandina E₂ (PGE₂, por sus siglas en inglés *Prostaglandin E2*) y HLA-G5 y también pueden obstaculizar el ciclo celular de las DCs e inhibir su maduración y función (Lotfinegad *et al*, 2014).

Los mecanismos por los cuales las MSCs ejercen su efecto antiproliferativo aún no se han aclarado por completo, se ha propuesto que varias moléculas actúan juntas o de forma alternada, en función de las condiciones ambientales a las que se tienen expuestas a las MSCs (Figura 10). Los estudios en animales y humanos han mostrado que aunque el efecto requiere una fase inicial de contacto célula-célula, el mecanismo es mediado por

varios factores, que incluyen el Factor de Crecimiento Transformante β -1 (TGF- β 1, por sus siglas en inglés *Transforming Growth Factor Beta 1*), IDO, PGE₂, Óxido Nítrico (NO, por sus siglas en inglés *Nitric Oxide*), Hemo-Oxigenasa-1 (HO-1, por sus siglas en inglés *Heme Oxygenase 1*) e insulina como factor de crecimiento de proteínas de unión (Trento *et al*, 2010). En otros trabajos se ha demostrado que las MSCs al interactuar con cada una de las células del sistema inmune, son capaces de alterar su actividad mediante la inhibición de 2 citocinas proinflamatorias importantes: el TNF- α e IFN- γ y mediante el aumento de citocinas supresoras (Aggarwal *et al*, 2005).

Por todo lo anterior, las MSCs son candidatos prometedores para la terapia de inmunomodulación que se está probando actualmente en el ámbito clínico. Estudios recientes han sugerido que las MSCs pueden influir en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, como las respuestas inmunes e inflamatorias, comprobando esto al suprimir la respuesta inmune en una gran variedad de ensayos *in vitro* y modelos de enfermedad. Esto puede ser benéfico para los pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes, las cuales se caracterizan por el reconocimiento de antígenos propios, la subsecuente respuesta inmune contra los tejidos y órganos del paciente, o rechazo de trasplante (Popp *et al*, 2009; Trento *et al*, 2010).

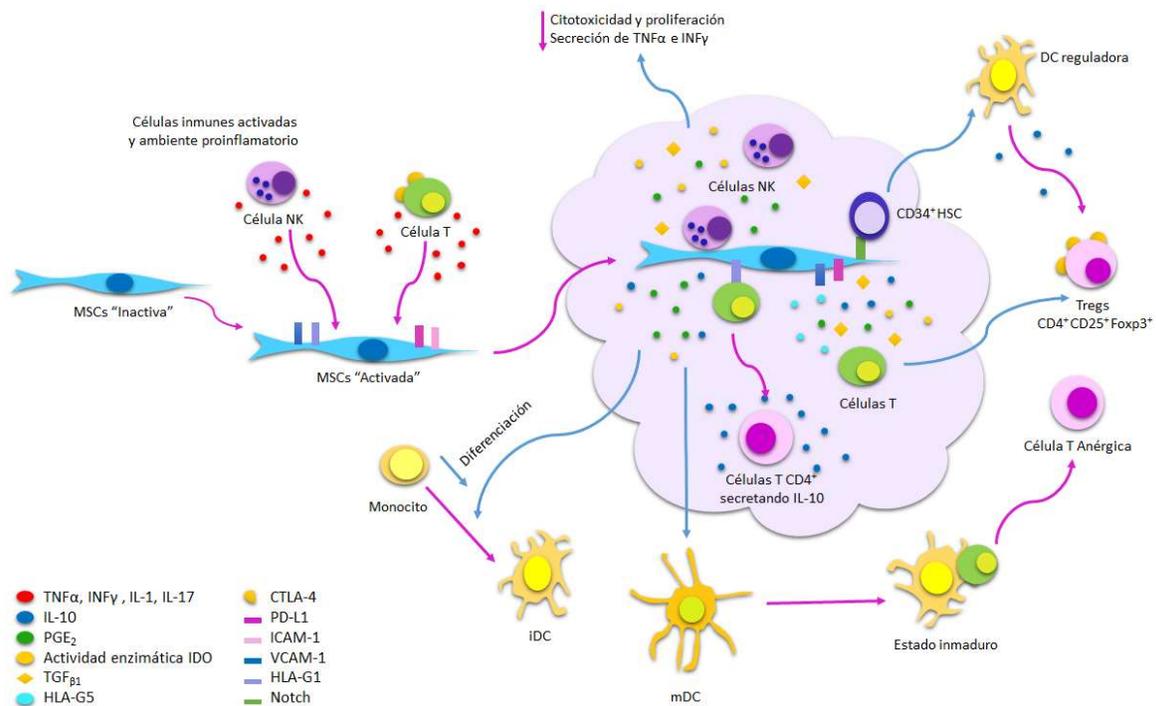


Figura 10. Efectos inmunorreguladores de las MSCs en células inmunes. Los factores proinflamatorios tales como el IFN secretadas por las células NK activadas y los linfocitos T, apoyan la inmunoregulación mediada por MSCs y pueden aumentar o inducir la producción de moléculas inmunosupresoras. IDO, PGE $_2$, TGF- β 1 y moléculas de membrana están implicados principalmente en la inmunoregulación de MSCs sobre las células NK. IDO, PGE $_2$ e IL-10 están implicados en la disminución de la diferenciación de los monocitos en células dendríticas inmaduras (iDCs, por sus siglas en inglés *immature Dendritic Cells*) y puede inducir mDCs hacia un estado inmaduro, lo cual resulta en células T anérgicas y en una inapropiada activación de linfocitos T. Las MSCs inducen la diferenciación de progenitores hematopoyéticos CD34 $^+$ en una población de DCs reguladoras, que a su vez estimulan la generación de células T reguladoras Foxp3 $^+$ (Tomada de Castro *et al*, 2015).

6. MSC Y PSORIASIS

Algunos autores han considerado que la psoriasis es una enfermedad autoinmune, mediada por un precursor del linfocito T, sin embargo, los mecanismos exactos de la enfermedad, las poblaciones celulares que participan en el desarrollo, mantenimiento de la lesión y el origen de las células anormales, aún se desconocen. Se ha sugerido la posible participación de las MSCs en la enfermedad y aunque actualmente existen algunos trabajos acerca de su detección y participación, aún no se ha establecido de manera fehaciente su presencia en la piel y más aún, no es claro el papel que cumplen estas células en la enfermedad (Liu *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2012).

Como se mencionó anteriormente, las MSCs son otro tipo de células troncales que habitan en MO e intervienen en la respuesta inmune, pero también éstas secretan citocinas implicadas en la proliferación y diferenciación celular, creando el microambiente de las HSCs con factores como GM-CSF, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 e IL-15 apoyando así la hematopoyesis en individuos sanos. Estudios anteriores aseguran que las HSCs juegan un papel clave en la patogénesis de la psoriasis, al presentar un microambiente hematopoyético anormal, ocasionado por la secreción alterada de diferentes citocinas por parte de las MSCs. Se ha encontrado que el factor de células totipotenciales (SCF, por sus siglas en inglés *Stem Cell Factor*), el factor estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) e IL-6 se incrementan en cultivos *in vitro* de MSCs-MO obtenidas de pacientes con psoriasis, mientras que IL-1a, IL-1b, IL-3, IL-8, el factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés *Epidermal Growth Factor*), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés

Vascular Endothelial Growth Factor), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor Alpha*), el factor inhibidor de leucemia (LIF, por sus siglas en inglés *Leukemia Inhibitory Factor*), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés *Hepatocyte Growth Factor*) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés *Platelet-Derived Growth Factor*) disminuye. Se ha estipulado que esta secreción anormal es provocada por una anomalía en las MSCs en lugar de una respuesta inflamatoria sistémica provocada por la enfermedad (Liu *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2012).

Por otro lado, las MSCs obtenidas de MO, también se caracterizan por su capacidad de diferenciarse en múltiples linajes mesenquimales, incluyendo osteocitos, condrocitos, adipocitos, células endoteliales y células del músculo esquelético bajo condiciones controladas *in vitro*. Los estudios han encontrado que MSCs de los pacientes con psoriasis, tienen una menor capacidad proliferativa, de pasaje y son más propensas a diferenciarse en células endoteliales vasculares en comparación con los de los sujetos sanos en las mismas condiciones de inducción. Además, esta capacidad de diferenciación es paralela a la gravedad de la enfermedad (Zhang *et al*, 2012).

Oriaciani y colaboradores aislaron MSCs de biopsias de piel de pacientes con psoriasis, donde se estudió la expresión inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS, por sus siglas en inglés *Nitric Oxide Synthase*) y el VEGF. Se aislaron MSCs de pacientes con la enfermedad y se compararon con las MSCs obtenidas de sujetos saludables, con el fin de analizar si estas células muestran algunos perfiles típicos de psoriasis y entender si los eventos fisiopatológicos que conducen a la enfermedad comienzan temprano a nivel de

células troncales. Ellos encontraron que el microambiente en los pacientes con psoriasis difiere del microambiente presente en la piel sana, además, las MSCs pueden producir mediadores angiogénicos y proinflamatorios que conducen a una reducción en la capacidad antioxidante de las células, lo que contribuye al desarrollo de lesiones de la piel en la psoriasis (Orciani *et al*, 2011).

En un trabajo posterior se evaluó la expresión de VEGF, NO e iNOS y la respuesta antioxidante de las MSCs, tanto antes como después de 12 semanas de tratamiento con anti TNF- α . Sus resultados demostraron que el tratamiento con anti-TNF- α reduce la expresión inmunohistoquímica y la producción de VEGF y NO en MSCs de pacientes con psoriasis. Así, llegaron a la conclusión que el inhibidor es capaz de cambiar la vía fisiopatológica de la psoriasis sugiriendo que sus efectos terapéuticos se llevan a cabo a nivel de MSCs (Campanati *et al*, 2012).

Las MSCs obtenidas de diferentes fuentes y bajo distintos criterios, presentan un problema común, dado que imposibilita comparar los estudios realizados por los diferentes grupos de investigación y con ello se obstaculiza el progreso en el campo. A pesar de que la ISCT propone un conjunto de normas para definir MSCs de humanos, los trabajos realizados por distintos grupos de investigación, han caracterizado de manera poco profunda y detallada las características inmunofenotípicas y su capacidad de diferenciación. Tampoco, se han aislado las MSCs de las distintas capas que componen la piel, dermis y epidermis, por lo tanto, no se ha estudiado de manera independiente a las MSCs que las constituyen, para determinar el grado de participación de esta población celular en la patogénesis de la enfermedad.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

La psoriasis es una enfermedad crónica inflamatoria de la piel. Este órgano está compuesto por dos estructuras, la dermis y la epidermis, las cuales se encuentran alteradas tanto morfológicamente como en la composición de su microambiente en los niveles de citocinas y células inmunocompetentes que lo constituyen. De hecho, se ha propuesto que una combinación entre la proliferación de queratinocitos y la activación del sistema inmunológico de manera recurrente, es lo que mantiene de manera crónica esta enfermedad. Se ha sugerido la presencia de MSCs que pueden estar jugando un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la lesión debido a su capacidad inmunoreguladora. A la fecha no se ha realizado un estudio que determine de manera concluyente la presencia de MSCs en piel normal y de pacientes con psoriasis de acuerdo a las características que las definen como la morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica. Más aún, no se ha hecho un estudio comparativo de las características de las MSCs de las dos capas que constituyen la piel de pacientes con psoriasis, dermis y epidermis, con respecto a donadores sanos.

Debido a lo anterior, se hace necesario determinar la presencia de MSCs en dermis y epidermis de pacientes con psoriasis y establecer si sus características biológicas se ven alteradas en comparación con aquellas provenientes de donadores sanos y con ello iniciar el estudio de la participación de las MSCs en el desarrollo de esta enfermedad.

IV. HIPOTESIS

Las MSCs provenientes de la dermis y epidermis de la piel de pacientes con psoriasis, presentarán diferentes características morfológicas, inmunofenotípicas y capacidad de diferenciación a las obtenidas de individuos sanos.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Determinar y comparar la morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación de las MSCs provenientes de dermis y epidermis de pacientes con psoriasis y donadores sanos.

2. Objetivos particulares

- Obtención de MSCs provenientes de biopsias de piel de dermis y epidermis de pacientes con psoriasis e individuos sanos.
- Evaluar la morfología de las MSCs obtenidas de las biopsias de dermis y epidermis de pacientes con psoriasis e individuos sanos.
- Evaluar el inmunofenotipo de las MSCs obtenidas las biopsias de dermis y epidermis de los pacientes con psoriasis e individuos sanos.
- Determinar la capacidad de diferenciación de las MSCs obtenidas de dermis y epidermis de pacientes con psoriasis e individuos sanos hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

VI. MÉTODO

1. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE MSCs

En el presente estudio se lograron obtener MSCs de piel de pacientes con Psoriasis y donadores sanos. Las biopsias de piel fueron obtenidas de pacientes con Psoriasis que acudieron al servicio dermatológico del hospital “Adolfo López Mateos” perteneciente al ISSSTE. Las biopsias fueron tomadas con sacabocados de 5mm de diámetro (Figura 11). Se recolectaron muestras de piel de una región lesionada y de piel no lesionada cercana a la lesión y se solicitó a los pacientes que 15 días antes de la toma de la biopsia se suspendiera el tratamiento en aquellos que lo tuvieran. La piel sana se obtuvo a partir de individuos sometidos a cirugías gastrointestinales practicadas en el hospital de especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

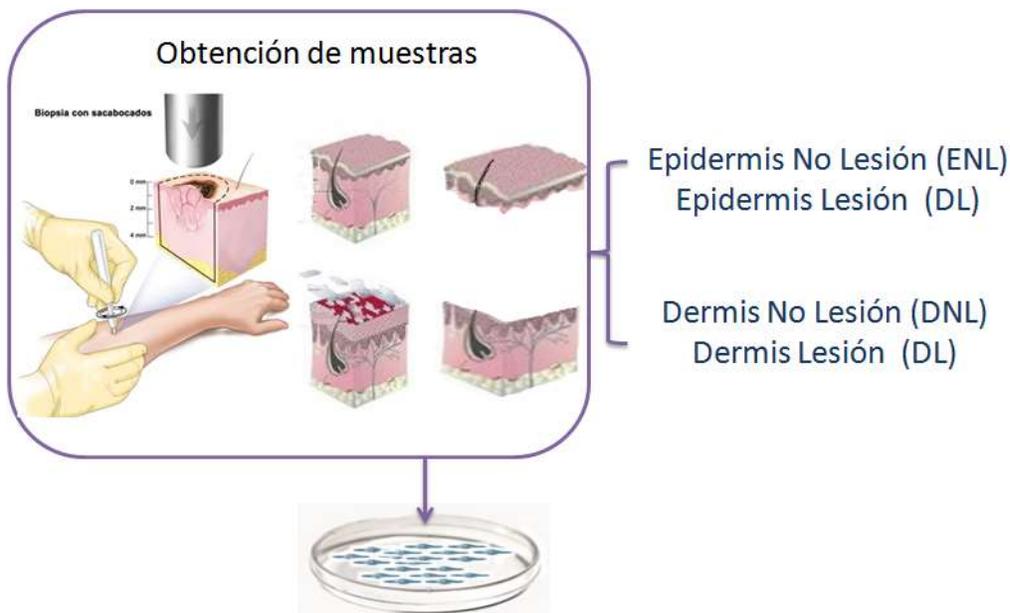


Figura 11. Toma de biopsia de pacientes con psoriasis.

La biopsia de piel lesionada y sin lesión se colocó en un tubo con dispasa 1mg/mL (Proteasa grado II, Roche) y 2mL de RPMI 1640 (GIBCO Invitrogen) suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF, Invitrogen Gibco, USA) al 10%, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se separó la dermis de la epidermis y ambas fueron colocadas por separado en placas de cultivo (35mm X 10mm, Corning) con medio RPMI 1640 (GIBCO Invitrogen) suplementado durante 72 horas a 37°C y 5% CO₂, para facilitar la salida de las células del tejido.

Después de 17- 20 días de cultivo las células adheridas a la placa se despegaron y sembraron en cajas petri 100mm con medio de cultivo modificado de Basal Medium Eagle (DMEM, por sus siglas en inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Media*, Gibco BRL, Rockville, MD) bajo en glucosa suplementado con 10% de SFB, 10µL/ml de penicilina-estreptomicina, 10µL/ml de gentamicina y 10µL/ml de L-glutamina. Cuando se observó una confluencia del 85%, las células fueron despegadas para su caracterización morfológica, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación.

2. ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Para determinar su morfología se sembraron 6×10^4 células en una caja petri de 100mm. Al observar una confluencia del 70% fue desechado el medio y se realizó un lavado con PBS. Las células se tiñeron con azul de Toluidina durante 1 hora. La caja fue lavada con agua destilada y se dejó secar. Posteriormente se observó bajo el microscopio y fue evaluada la presencia de diferentes tipos de células de acuerdo a su morfología en

20 campos al azar por caja y como se ha establecido previamente en nuestro laboratorio (Montesinos *et al*, 2009).

3. INMUNOFENOTIPO

Para determinar el inmunofenotipo de las MSCs obtenidas, se cosecharon con una solución de 0.05% de tripsina-0.02% EDTA (GIBCO) durante 5 minutos, posteriormente, se realizó un lavado con PBS 10% de SFB. Un total de 1.5×10^5 células fueron resuspendidas en 10 μ l de PBS 3% de SFB EDTA 1Mm e incubadas durante 20 minutos a 4°C protegidas de la luz con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados a FITC, PE o APC dirigidos contra CD73, CD90, CD45, CD105, CD13, CD14, HLA-ABC, HLA-DR, CD31, CD146 y CD34. Posteriormente, las células se lavaron con 500 μ l de PBS 1X, 3% de SFB, EDTA 1mM y se fijaron con FACS LysingSolution (BD, Bioscience San José, CA). Las células marcadas fueron analizadas en el citómetro de flujo CyAN de DAKO y se colectaron un mínimo de 10,000 eventos. Los datos fueron analizados con el software FlowJo 7.6 (Montesinos *et al*, 2009).

4. CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN

4.1 Inducción adipogénica: Las MSCs se cultivaron en cajas petri de 35mm en presencia de medio de diferenciación adipogénico, compuesto por DMEMbg suplementado con dexametasona 1 μ M, IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) 0.5mM, insulina 10 μ M, indometacina 200 μ M y SFB 10%. Durante 2 semanas se realizaron cambios de medio cada 4 días. Al terminar las 2 semanas de cultivo con el medio de diferenciación adipogénica, éste fue retirado de la caja y se enjuagó con agua destilada. Posteriormente, se adicionó formol buffer al 10% por 5 minutos, al término de este tiempo, el formol

buffer fue retirado y se adicionó propilenglicol absoluto por 5 minutos, después, se adicionó rojo oleoso durante 1 hora a una temperatura de 60°C. Al término de la hora, el rojo oleoso fue retirado y adicionado propilenglicol al 85% durante 2 minutos. Finalmente, se contratiñó con Hematoxilina de Harris (Montesinos *et al*, 2009).

4.2 Inducción osteogénica: Para evaluar la diferenciación osteogénica se utilizaron dos técnicas, Von Kossa y la tinción de fosfatasa alcalina, las cuales se describen posteriormente. Inicialmente las MSCs fueron cultivadas en cajas petri de 35mm en presencia de medio de diferenciación osteogénico, compuesto por DMEMbg suplementado con dexametasona 0.1µM, ácido ascórbico 50µg/ml, β-glycerol fosfato 10mM, ascorbato-2-fosfato 50µg/ml y 10% de suplemento osteogénico. Durante 4 semanas se realizaron cambios de medio cada 4 días (Montesinos *et al*, 2009).

Von Kossa: Al término de las 4 semanas de cultivo con el medio de diferenciación osteogénica, éste se retiró de la caja, se enjuagó con agua destilada y se agregó formol buffer al 10% por 1 hora. Posteriormente, el formol buffer fue retirado y se adicionó nitrato de plata al 5%, exponiéndose a la luz durante 1 hora, realizando después un lavado de 1 minuto con hiposulfito de sodio al 5%. Finalmente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada y fue adicionado 1 ml de azul de toluidina durante 2 min. (Kern *et al*, 2006).

Fosfatasa Alcalina: Al término de las 4 semanas de cultivo con el medio de diferenciación osteogénica, éste fue retirado de la caja y se enjuagó con agua desionizada. Posteriormente, se agregó metanol por 5 min. Pasado este tiempo, el metanol fue retirado y se adicionó agua desionizada para lavar. Se agregó 700 µl del sustrato SIGMA

FAST BCIP/NBT, homogenizando lentamente por vaivén y en total oscuridad las cajas durante 10 min. El sustrato fue retirado y se realizó un último lavado con agua desionizada.

4.3 Inducción condrogénica: Las MSCs fueron cultivadas en 500 μ L de medio de diferenciación condrogénico compuesto por DMEMbg suplementado con dexametasona 0.1 μ M, piruvato de sodio 100 μ g/ml, prolina 40 μ g/ml, ascorbato-2-fosfato 50 μ m, ITS 2ml/100ml y SFB al 10% todo lo anterior en presencia de 10ng/ml de TGB- β (Cambrex). Se cultivaron por 4 semanas y se realizaron cambios de medio cada 4 días. Al terminar las 4 semanas de cultivo con medio de diferenciación condrogénica, fue desechado el medio, se fijó la micromasa con formaldehído y se deshidrató con diluciones de etanol (al 70%, 90% y absoluto) y xilol grado histológico durante 15 minutos con dos repeticiones cada una. La micromasa se embebió en parafina y se realizaron cortes histológicos con ayuda de un micrótopo. La detección de la diferenciación condrogénica se realizó con las tinciones de azul alciano para observar la positividad a mucopolisacáridos y con tricrómico de Masson para determinar la presencia de colágeno (Montesinos *et al*, 2009).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos son expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM), calculada de 3-5 experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS 20.0. La comparación entre los grupos se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis seguido por Mann-Whitney Test. Valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos.

VII. RESULTADOS

1. OBTENCION DE MSCs PROVENIENTES DE PACIENTES CON PSORIASIS E INDIVIDUOS SANOS

Se recolectaron muestras de piel de una región lesionada y de piel no lesionada cercana a la lesión y se solicitó a los pacientes que 15 días antes de la toma de la biopsia se suspendiera el tratamiento en aquellos que lo tuvieran. La piel sana se obtuvo a partir de individuos sometidos a cirugías gastrointestinales practicadas en el hospital de especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Las muestras se clasificaron de la siguiente manera: Dermis Sano (DS), Dermis No Lesión (DNL), Dermis Lesión (DL), Epidermis Sano (ES), Epidermis No Lesión (ENL) y Epidermis Lesión (EL) (Tabla 1). Las células obtenidas de las distintas muestras se caracterizaron analizando su morfología, inmunofenotipo y su capacidad de diferenciación a los distintos linajes de las MSCs. Los resultados obtenidos en DS ($n=5$), DNL ($n=5$), DL ($n=5$), ES ($n=5$), ENL ($n=3$) y EL ($n=5$) serán descritos en las siguientes secciones.

2. PORCENTAJE DE OBTECION DE MSCs

Se procesaron 51 muestras de pacientes con psoriasis y 5 de individuos sanos, resultando así en un 100% de obtención en muestras de DS, 90% DNL, 95% DL, 100% ES, 14% ENL y 75% EL (Tabla 1). Cabe mencionar que, en el caso de los pacientes con psoriasis, no siempre se logró la obtención de ambas muestras (dermis y epidermis). Por otra parte, estos resultados nos indican que es más sencilla la obtención de MSCs de las muestras provenientes de DS, DNL, DL, ES y EL en comparación con el porcentaje obtenido de la muestra de ENL.

Muestra	Número de muestras (obtenidas/procesadas)	Porcentaje de obtención
DS	5/5	100%
DNL	6 /7	90%
DL	19 /20	95%
ES	5/5	100%
ENL	3/21	14%
EL	6/8	75%

Tabla 1. Porcentaje de obtención de MSCs de las biopsias de piel. Se obtuvieron muestras de piel de donadores sanos y de pacientes con psoriasis. Se muestra el número de muestras obtenidas/procesadas y el porcentaje de obtención. Dermis sano (DS), dermis no lesión (DNL), dermis lesión (DL), epidermis sano (ES), epidermis no lesión (ENL) y epidermis lesión (EL). Obtención: Numero de muestras Numero de muestras obtenidas/procesadas. Se muestra el porcentaje de obtención de cada tipo de muestra.

3. MORFOLOGIA DE MSCs PROVENIENTES DE PACIENTES CON PSORIASIS E INDIVIDUOS SANOS

Para analizar la morfología celular, los cultivos de MSCs fueron teñidos con Azul de Toluidina. En todas las muestras se observó la morfología fibroblastoide característica de las MSCs (Figura 12A). Aunado a lo anterior, se logró identificar tres tipos de células morfológicamente diferentes:

- a) Grande: células con una extensión mayor de citoplasma ($93\pm 21\mu\text{m}$) (Figura 12B)
- b) Fibroblastoide, células en forma de huso. Dentro de esta población se encontraron células con diferentes tipos morfológicamente distinguibles: Romboide (R), citoplasma con cuatro vértices; Lamelopodia-Lamelopodia (L-L), citoplasma con dos extensiones en forma de hoja en extremos opuestos; Lamelopodia-Filopodia (L-F), citoplasma con extensiones en forma de hoja y de huso en extremos contrarios; Filopodia-Filopodia (F-F), citoplasma con dos extensiones del huso en extremos opuestos; Triangular (T), citoplasma con tres vértices ($45\pm 25\mu\text{m}$) (Figura 12B).
- c) Neural: células con extensiones citoplasmáticas parecidas a dendritas ($70\pm 6\mu\text{m}$) (Figura 12B)

Los tipos celulares encontrados en los cultivos son similares a los reportados previamente por nuestro grupo (Montesinos *et al*, 2009).

En las células grandes se encontraron diferencias significativas en ENL ($6.2 \pm 2.2\%$) vs DS ($1.3 \pm 0.9\%$), DNL ($0.9 \pm 1.0\%$), DL ($0.9 \pm 0.8\%$), ES ($0.7 \pm 0.4\%$) y EL ($0.8 \pm 0.3\%$).

La morfología celular más común encontrada en los cultivos fue la fibroblastoide, con sus respectivos subtipos, encontrando así diferencias significativas entre las muestras: DNL (L-L $2.4 \pm 1.6\%$) y DL (L-L $2.6 \pm 1.5\%$) vs ENL (L-L $13.1 \pm 3.0\%$) (Tabla 2).

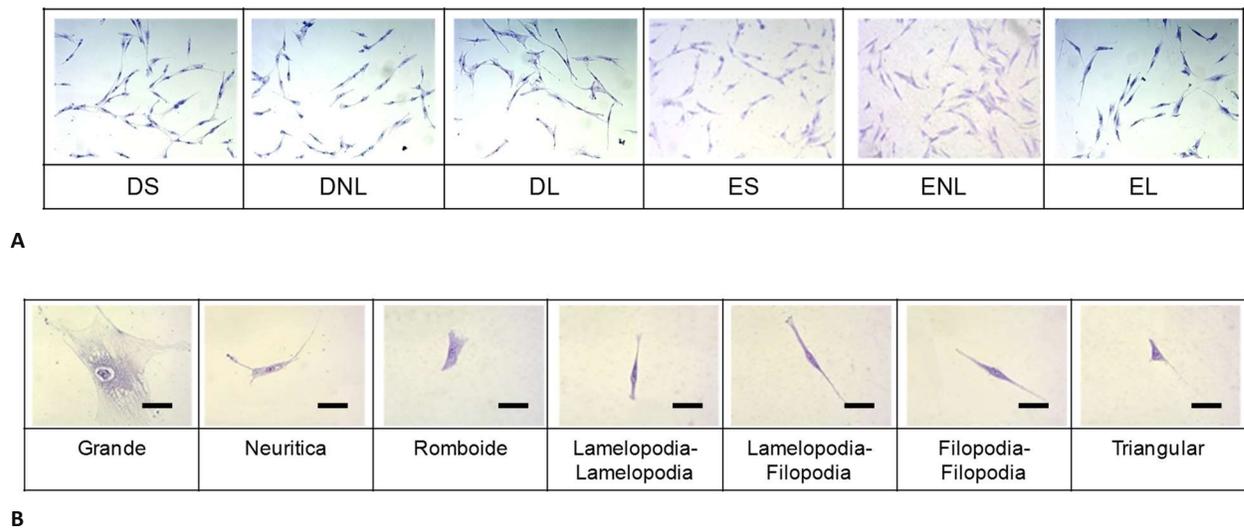


Figura 12. Morfología de MSCs de piel de pacientes con psoriasis y donadores sanos. (A) Se observaron diferentes tipos morfológicos en los cultivos celulares a partir de cada fuente. Imágenes representativas de MSCs a 6 días de cultivo, provenientes de las distintas fuentes: dermis sano (DS), dermis no lesión (DNL), dermis lesión (DL), epidermis sano (ES), epidermis no lesión (ENL) y epidermis lesión (EL), teñidos con Azul de Toluidina (Objetivo 10X); (B) Tipos celulares morfológicamente distintos: grande, neurítica y fibroblastoides (Romboide, Lamelopodia-Lamelopodia, Lamelopodia-Filopodia, Filopodia-Filopodia y Triangular) (Objetivo 20X, barra 100µm).

	Grande	Neurítica	Fibroblastoide				
			Romboide	Lame-Lame	Lame-Filo	Filo-Filo	Triangular
DS	1.3±0.9	0.8±0.8	69.8±12.1	4.1±4.1	8.5±3.8	7.7±0.7	7.4±3.9
DNL	0.9±1.0	0.9±0.8	75.5±8.4	2.4±1.6^δ	6.1±6.1	5.5±1.3	8.3±1.5
DL	0.9±0.8	1.8±1.8	72.0±7.2	2.6±1.5^δ	7.4±5.9	6.0±2.9	8.8±2.9
ES	0.7±0.4	0.8±0.3	68.9±15.8	5.0±4.3	7.9±6.7	8.0±6.1	5.2±2.5
ENL	6.9±2.2*	3.7±1.5	53.5±9.0	13.1±3.0	10.2±8.0	4.4±0.5	7.9±1.2
EL	0.8±0.3	0.9±0.3	77.5±20.7	3.6±4.1	6.0±6.7	6.4±7.1	4.5±3.0

Tabla 2. Morfología de MSCs de piel de pacientes con psoriasis y donadores sanos. Cada tipo celular fue nombrado dependiendo de sus características morfológicas observadas, los resultados se presentan en porcentajes de cada tipo celular y corresponden a la media de los valores a partir de experimentos separados. Dermis sano (DS) n=5, dermis no lesión (DNL) n=5, (DL) dermis lesión n=5, (ES) epidermis sano n=5, (ENL) epidermis no lesión n=3, (EL) epidermis lesión n=5 Media±desviación estándar de las distintas morfologías encontradas en los cultivos. (*) Representa la diferencia significativa entre ENL vs DS, DNL, DL, ES y EL. (δ) representa la diferencia significativa entre las muestras DNL y DL vs ENL.

Estos resultados nos indican que, dentro de los cultivos de MSCs de pacientes con psoriasis, se encuentran subpoblaciones con diferente morfología y que en cultivos de MSCs de individuos sanos, también se presentan las mismas subpoblaciones celulares, pero de manera interesante, se observaron diferencias significativas en las células con morfología grande y fibroblastoide de los cultivos de MSCs de pacientes que padecen la enfermedad con respecto a las de individuos sanos.

4. INMUNOFENOTIPO DE MSCs PROVENIENTES DE PACIENTES CON PSORIASIS E INDIVIDUOS SANOS

Para conocer el inmunofenotipo de las células MSCs provenientes de las biopsias de piel, se analizó la expresión de diferentes marcadores de superficie a través de análisis por citometría de flujo. Se observó un alto porcentaje de expresión de marcadores de superficie característicos para las MSCs tales como CD105, CD90, CD73 y CD13, así como la expresión de HLA-ABC. También, fueron negativas para HLA-DR, marcadores hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14 y CD146 y endoteliales como CD31 (Figura 13).

En lo correspondientes a la expresión de HLA-ABC, se observa heterogeneidad en las muestras y observamos diferencias significativas entre las MSCs de distintas muestras: DNL $86.8 \pm 19.0\%$ y DL $85.4 \pm 18.4\%$ vs DS $26.8 \pm 27.6\%$; ES $14.9 \pm 16.0\%$ y ENL $8.9 \pm 6.5\%$ vs la DNL $86.8 \pm 19.0\%$; y por último ES $14.9 \pm 16.0\%$ y ENL $8.9 \pm 6.5\%$ vs DL $85.4 \pm 18.4\%$ (Grafica 1).

Respecto la expresión de CD105, CD90 y CD73, observamos homogeneidad entre las muestras, aunque este resultado no es significativo. De la misma forma, lo encontrado en el marcador CD13 muestra homogeneidad al presentar porcentajes mayores al 97% en los seis casos (Tabla 3).

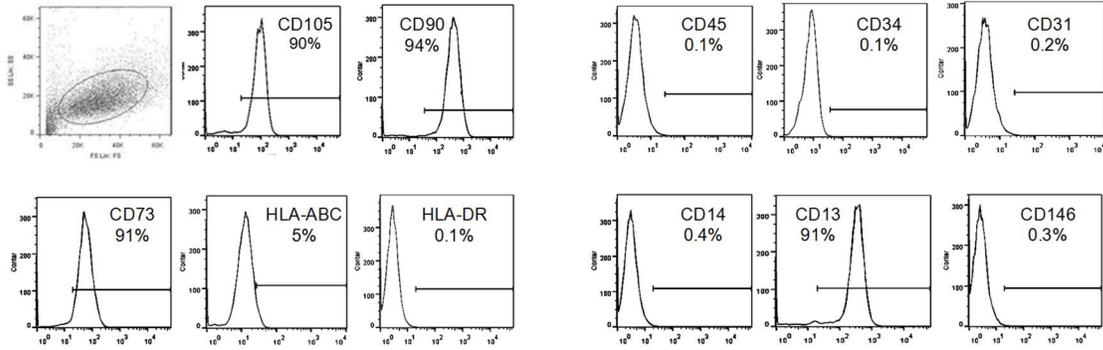
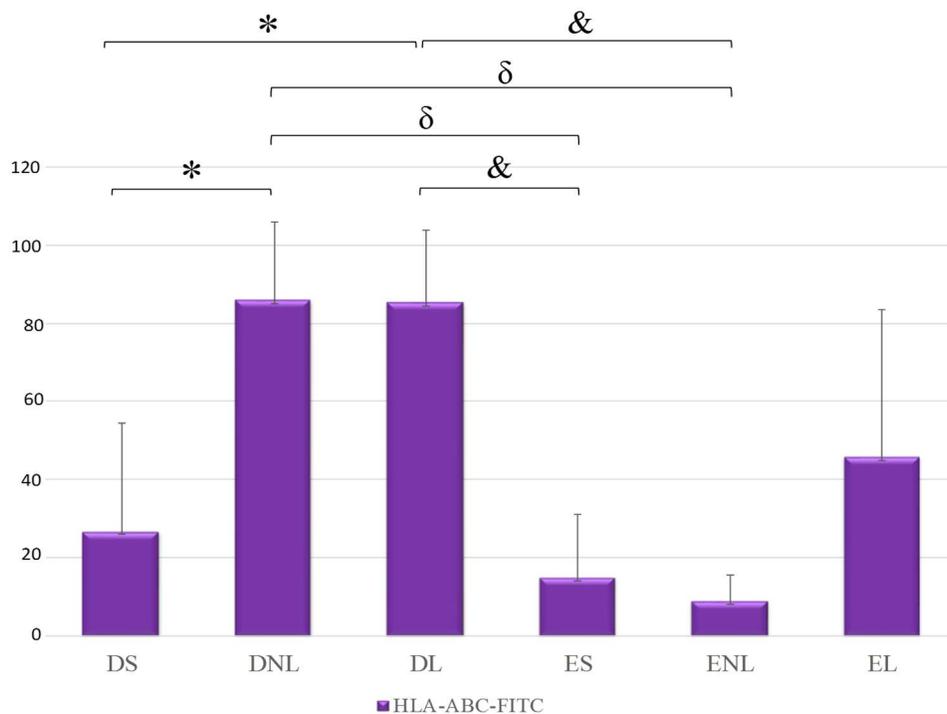


Figura 13. Citometría de flujo. Histogramas representativo de un experimento donde se muestra la expresión de marcadores de superficie de las MSCs de las distintas fuentes: dermis sano (DS), dermis no lesión (DNL), dermis lesión (DL), epidermis sano (ES), epidermis no lesión (ENL), epidermis lesión (EL).

	DS (n=5)	DNL (n=5)	DL (n=5)	ES (n=5)	ENL (n=3)	EL (n=5)
CD105-PE	97.0± 3.8	99.7± 0.3	99.6± 0.5	98.0±2.2	99.8±0.0	99.6±0.2
CD90-APC	98.0± 2.0	99.9± 0.1	99.6± 0.7	98.5±1.5	100.0±0.0	99.7±0.2
CD73-PE	89.7± 17.0	98.7± 2.3	99.7±0.3	82.5±20.6	75.4±34.7	88.0±26.0
HLA-ABC-FITC	26.8± 27.6	86.0± 19.8*	85.4±18.4*	14.9±16.0 ^{δ&}	8.9±6.5 ^{δ&}	45.9±37.5
HLA DR-PE	0.5± 0.5	1.9± 1.8	1.3±0.7	0.3±0.2	0.4±0.3	0.8±0.1
CD45-FITC	1.0± 0.6	1.4± 0.9	1.3±0.5	1.0±0.8	1.1±0.6	0.8±0.3
CD34-APC	1.0± 1.0	8.5± 4.5	3.7± 3.7	2.4±1.3	2.7±2.3	0.9±0.6
CD31-FITC	0.9± 0.5	1.2± 0.9	1.7± 1.0	0.7±0.1	1.1±0.1	0.8±0.3
CD14-PE	0.7± 0.5	6.4± 5.5	2.6± 1.2	0.4±0.2	1.5±1.9	1.9±1.1
CD13-PE	97.8± 3.6	99.9± 0.0	99.9± 0.0	97.7±2.0	100.0±0.0	99.8±0.1
CD146-PE	5.8± 9.4	30.2± 28.9	15.1± 8.5	23.1±22.2	5.7±4.1	22.7±13.0

Tabla 3. Expresión de marcadores de superficie. Expresión de marcadores característicos de MSCs de dermis sano (DS), dermis no lesión (DNL), dermis lesión (DL), epidermis sano (ES), epidermis no lesión (ENL), epidermis lesión (EL), determinado por citometría de flujo. Los valores se muestran en porcentajes de células positivas para los distintos marcadores y corresponden a la media±desviación de los valores a partir de experimentos individuales: DS n=5, DNL n=5, DL n=5, ES n=5, ENL n=3 y EL n=5. (*) Representa la diferencia significativa entre las muestras DNL y DL vs DS, (^δ) representa la diferencia significativa entre las muestras ES y ENL vs la DNL y ([&]) representa la diferencia significativa entre las muestras ES y ENL vs DL.



Grafica 1. Expresión de HLA-ABC en MSCs de las diferentes fuentes. En la gráfica se muestran las diferencias significativas encontradas en el análisis del marcador de superficie HLA-ABC tanto en las muestras de donadores sanos como las de pacientes con psoriasis. (*) Representa la diferencia significativa entre las muestras DNL y DL vs DS, (δ) representa la diferencia significativa entre las muestras ES y ENL vs la DNL y (&) representa la diferencia significativa entra las muestras ES y ENL vs DL.

Estos resultados nos indican que la expresión de HLA-ABC presenta diferencias significativas en MSCs de las distintas muestras. Podríamos especular que estos resultados están arrojando indicios de que las células están presentando un comportamiento alterado con respecto a las capacidades comúnmente encontradas en las MSCs, lo que podría repercutir en su capacidad de inmunosupresión y proliferación. Lo anterior se analizará a detalle más adelante.

5. CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE MSCS PROVENIENTES DE PACIENTES CON PSORIASIS E INDIVIDUOS SANOS

La capacidad de diferenciación de las MSCs de DS, DNL, DL, ES, ENL y EL fue analizada después de haberlas cultivado bajo condiciones particulares que favorecían la diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica, así como sus respectivos controles cultivándolas en ausencia de medio inductor.

5.1 Diferenciación adipogénica. Se determinó la capacidad de diferenciación adipogénica de las MSCs de DS, DNL, DL, ES, ENL y EL, después de haber inducido los cultivos celulares con medio de diferenciación durante 4 semanas. En los cultivos, se encontró la formación de adipocitos con vacuolas lipídicas al ser observadas bajo el microscopio, las cuales fueron positivas para la tinción con Rojo Oleoso (Figura 13). Las MSCs cultivadas en ausencia de medio inductor, no presentan la formación de células con vacuolas lipídicas, ni positividad a la tinción con Rojo Oleoso. Cabe destacar que en los cultivos de MSCs de ENL en presencia de medio inductor, no se observó la formación de células con las mismas características de las otras muestras y la positividad fue escasa en comparación a los adipocitos formados en los cultivos de DL en donde se encontró un mayor número de estos.

Lo anterior nos indica que las MSCs de las distintas muestras tiene la capacidad de formar adipocitos, pero es de resaltar que ésta es menor en comparación a la encontrada en MO, después de haber sido estimulados con medio de diferenciación adipogénico, aunque esta capacidad se ve aún más disminuida en ES y ENL. Este antecedente podría

indicar una alteración de la características y funciones comúnmente encontradas en las MSCs con respecto a todas las muestras de piel de pacientes con psoriasis.

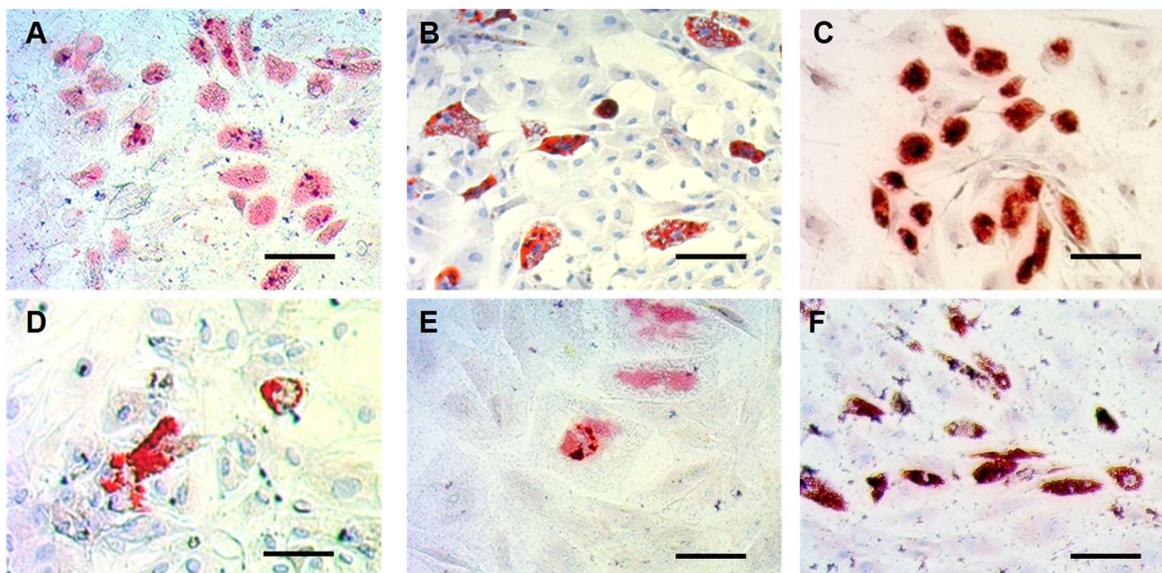


Figura 13. Diferenciación adipogénica de MSCs de piel de pacientes con psoriasis y donadores sanos. La diferenciación adipogénica fue indicada por la acumulación de vacuolas lipídicas teñidas por rojo oleoso (Objetivo 20X). Cultivos celulares de (A) DS, (B) DNL, (C) DL, (D) ES, (E) ENL, (F) EL con inducción adipogénica, positiva a rojo oleoso con formación de adipocitos con vacuolas lipídicas (Objetivo 20X, barra 100 μ m).

5.2 Diferenciación osteogénica. Se determinó la capacidad de diferenciación osteogénica de las MSCs de las distintas fuentes, después de haber inducido los cultivos celulares con medio de diferenciación durante 4 semanas. En todas las muestras se observó el potencial de diferenciación, el cual fue comprobado por la positividad a la tinción fosfatasa alcalina (Figura 14) y Von Kossa (Figura 15) para cada una de las muestras. Las células que fueron cultivadas en ausencia de medio inductor también presentaron positividad, pero en menor porcentaje.

Los resultados nos indican que las MSCs de la piel de pacientes con psoriasis tienen la capacidad de diferenciarse hacia el linaje osteogénico, tanto en ausencia como presencia de medio inductor.

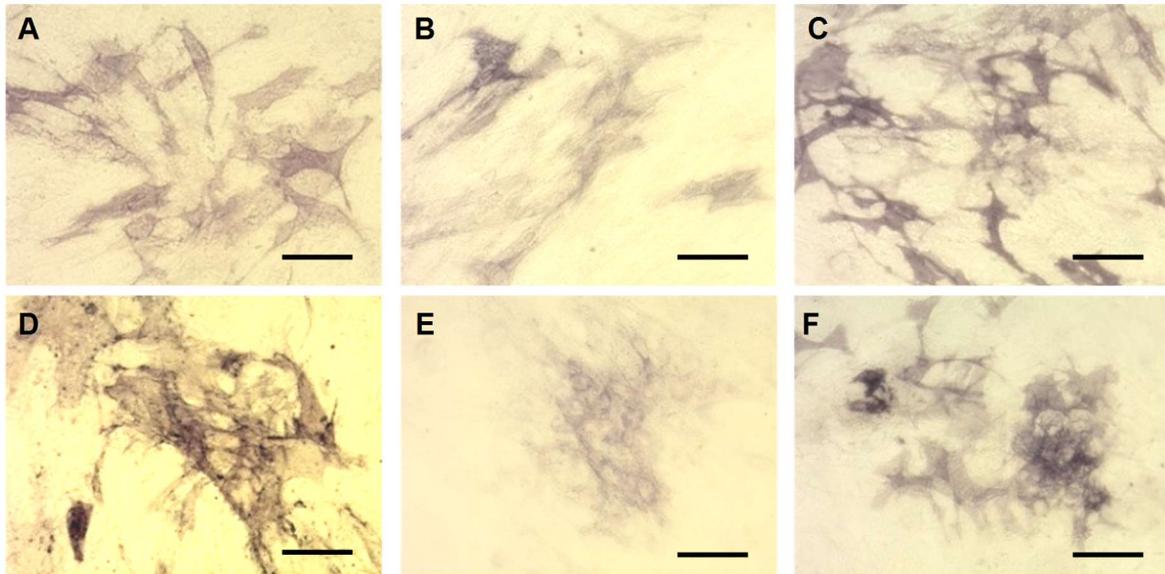


Figura 14. Diferenciación osteogénica de MSCs de piel de pacientes con psoriasis y donadores sanos. La diferenciación osteogénica es indicada por la actividad positiva de la enzima fosfatasa alcalina presente en el cultivo. Cultivos celulares de (A) DS, (B) DNL, (C) DL, (D) ES, (E) ENL y (F) EL con inducción osteogénica, positiva por fosfatasa alcalina (Objetivo 20X, barra 100 μ m).

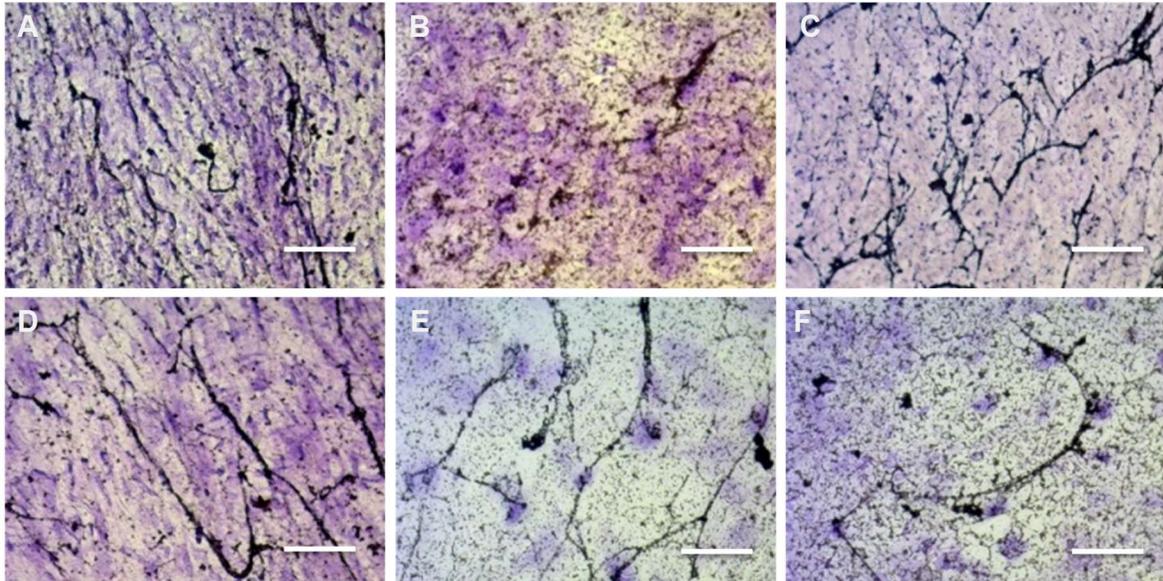


Figura 15. Diferenciación osteogénica de MSCs de piel de pacientes con psoriasis y donadores sanos. La diferenciación osteogénica es indicada por la presencia de depósitos de calcio positivos a la tinción de Von Kossa, la positividad se observa de color café y negro. Cultivos celulares de (A) DS, (B) DNL, (C) DL, (D) ES, (E) ENL, (F) EL con inducción osteogénica, positiva a la tinción Von Kossa con formación de depósitos de calcio (Objetivo 20X, barra 100 μ m).

5.3 Diferenciación condrogénica. Se determinó la capacidad de diferenciación condrogénica de las MSCs de las diferentes muestras después de haberlas inducido con medio de diferenciación durante 4 semanas en un sistema de micromasa. Las MSCs de las diferentes muestras se diferenciaron hacia condrocitos, produciendo mucopolisacáridos que fueron revelados con la tinción de azul alciano (Figura 16). Al observar los cortes histológicos bajo el microscopio se identificaron la diferenciación hacia cartílago hialino en todas las muestras, el cual se caracterizó por crecer en pequeños grupos localizados en una misma área y rodeados por una matriz extracelular, mostrando una coloración grisácea. También, se observó la diferenciación hacia cartílago fibroso en todas las fuentes, el cual se caracterizó por la formación de fibras de colágeno, que mostraron una coloración azul con la tinción tricrómico de Masón (Figura 17).

Respecto al crecimiento de la micromasa de la muestra ENL, era visualmente más pequeña en comparación a las otras muestras y no se formaba de una forma consistente. Cabe mencionar que la micromasa formada por ENL, se destacó por su reducido tamaño y su falta de consistencia, en comparación con las otras 5 muestras. Lo anterior nos indica que las MSCs de las biopsias de piel de pacientes con psoriasis son capaces de diferenciarse a el linaje condrogénico, aunque la formación de la micromasa y la formación de cartílago es diferente en las distintas muestras. Las diferencias encontradas en cada micromasa se discutirán mas adelante.

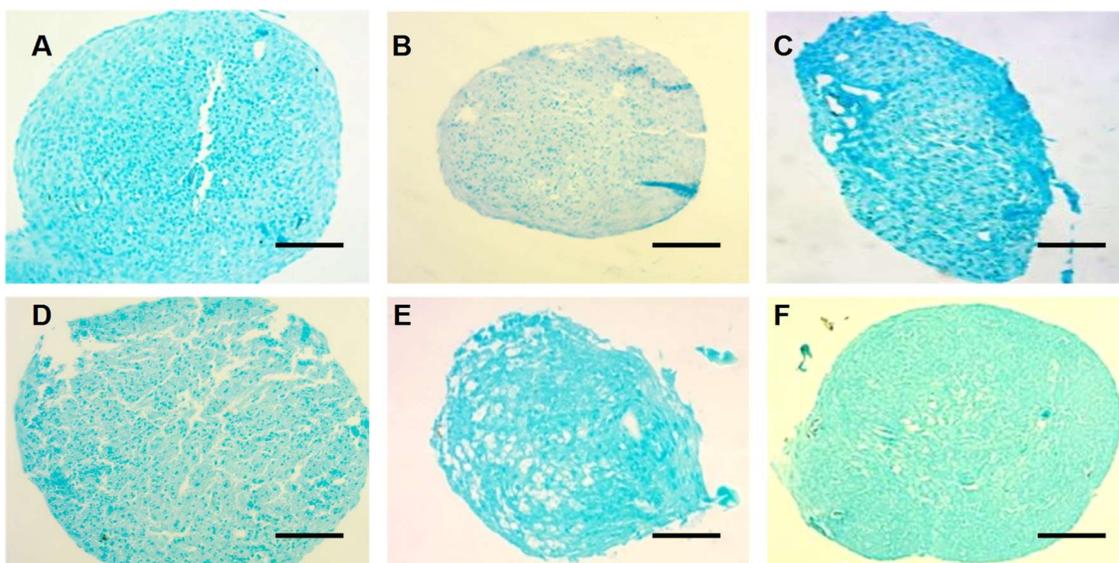


Figura 16. Diferenciación condrogénica de MSCs de piel de pacientes con psoriasis y donadores sanos. La formación de cartílago fue analizada por la morfología celular y el colágeno producido en la micromasas a partir de las seis fuentes La diferenciación condrogénica fue indicada por la presencia de mucopolisacáridos positivos a la tinción con azul alciano en cortes histológicos de micromasas: (A) DS, (B) DNL, (C) DL, (D) ES, (E) ENL, (F) (Objetivo 20X, barra 100 μ m).

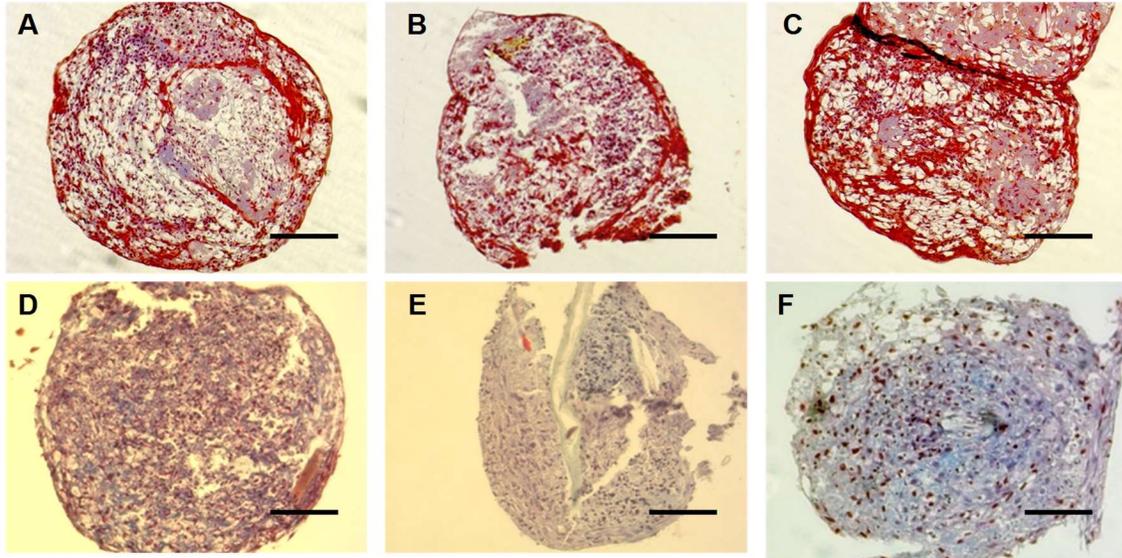


Figura 17. Diferenciación condrogénica de MSCs de piel de pacientes con psoriasis y donadores sanos El tipo de cartílago fue analizado por la morfología celular y el colágeno producido en la micromasas a partir de las seis fuentes. Hialocartilago: caracterizado por la presencia de grupos celulares rodeados por una matriz concentrada localizados dentro de la misma área y teñida de color gris. Fibrocartilago: caracterizado por la presencia de fibras de colágeno teñidas de color azul por la tinción Tricrómico de Masón: (A) DS, (B) DNL, (C) DL, (D) ES, (E) ENL, (F) (Objetivo 20X, barra 100µm).

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

La psoriasis es una de las enfermedades crónicas más comunes, afectando al 3% de la población adulta. Debido a la frecuencia de esta enfermedad en todo el mundo y sus características clínicas, se ha ganado el interés de muchos grupos de investigación alrededor del mundo. Hace décadas, se creía que la psoriasis era una enfermedad, causada principalmente por queratinocitos aberrantes, resultando en la hiperproliferación incontrolada de las capas epidérmicas. Actualmente, la psoriasis se considera una enfermedad autoinmune y la mayoría de los científicos están de acuerdo en la importancia central de las células T en la patogénesis de la enfermedad, sin embargo, es sabido que diversas poblaciones celulares, como las células troncales, participan en la patogénesis de la enfermedad (Eberle *et al*, 2016).

Existen células maestras, capaces de dar origen a todos los distintos tipos celulares del tejido en el que se localizan. Estas células troncales somáticas se identificaron por primera vez en el sistema hematopoyéticos de ratones, sin embargo, a lo largo de los años, se ha demostrado la presencia en otros tejidos, como la piel, el músculo, el hígado y hasta el cerebro (Mayani, 2009).

La definición de célula troncal debe basarse en términos funcionales, ya que estas células no poseen características morfológicas que puedan distinguirlas del resto de las células del tejido al que pertenecen. En este contexto, las células troncales se han definido como células no diferenciadas con alta capacidad de auto renovación que pueden dar origen a uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el

organismo: estas células se sitúan al inicio del linaje de un tejido determinado (Figura 8 y 9) (Mayani, 2009).

Las MSCs son células progenitoras multipotentes que fueron descritas por primera vez por Caplan en 1991. Estas células fueron aisladas, por primera vez, de MO y se caracterizan por su capacidad de diferenciación hacia linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico. Actualmente, las MSCs, han sido aisladas de múltiples tejidos: músculo esquelético, tejido adiposo, membranas sinoviales, pulpa dental, ligamentos periodontales, tejido cervical, sangre menstrual, gelatina de Wharton, cordón umbilical, sangre de cordón umbilical, líquido amniótico, placenta, piel y tejidos fetales (Castro-Manreza *et al*, 2015). En la mayoría de los casos, las MSCs aisladas presentan una capacidad de diferenciación y proliferación heterogénea, aunque todas expresan los marcadores característicos de MSCs (Zhao *et al*, 2016).

MSCs cultivadas *in vitro* poseen tres propiedades biológicas que las hacen aptas para su uso en terapia celular: amplio potencial de diferenciación, la secreción de factores tróficos que favorecen remodelación de tejidos y propiedades inmunoregulatoras, aunado a su capacidad de apoyar la hematopoyesis, por lo tanto, las MSCs han sido ampliamente utilizadas para trastornos de origen inmunitario (Castro-Manreza *et al*, 2015; Zhao *et al*, 2016).

Debido a que no existe un marcador definitivo para MSC, la ISCT ha establecido ciertos criterios mínimos que las poblaciones celulares *in vitro* debe cumplir para ser consideradas MSC. Las células deben ser positivas para CD105, CD73, CD90, expresar

niveles bajos de MHC-I y ser negativas para MHC-II, CD11b, CD14, CD34, CD45 y CD31. Además, estas células deben ser capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Castro-Manrreza *et al*, 2015; Dominici *et al*, 2006; Golpanian *et al*, 2016; Kalluri, 2016).

Como nuestro grupo de trabajo lo ha reportado anteriormente, múltiples estudios han demostrado las propiedades inmunoregulatoras de estas células. Las MSCs afectan profundamente la respuesta inmune a través de sus interacciones con células como NK, DC, linfocitos T, linfocitos B, todas ellas componentes del sistema inmune innato y adaptativo. Debido a estas propiedades, las MSCs pueden impedir la activación inapropiada de los linfocitos T y generar un entorno tolerogénico durante la reparación de heridas o detener la respuesta inmune durante la curación, lo que contribuye al mantenimiento de la homeostasis inmune (Figura 10) (Castro-Manrreza *et al*, 2015).

Anteriormente, diversos grupos de investigación han reportado que en el caso de la psoriasis, las MSCs presentan un comportamiento alterado y aberrante que induce el inicio y mantenimiento de la lesión, en la cual sus propiedades inmunomoduladoras y de reparación de tejidos no están ejerciendo ningún efecto (Campanati *et al*, 2012), presentando una secreción anormal de citocinas en los pacientes con psoriasis y se menciona que aunque su morfología, capacidad de diferenciación y capacidad de apoyar la hematopoyesis fueron similares a las MSCs provenientes de individuos sanos, las obtenidas de pacientes con psoriasis muestran proliferación, apoptosis y expresión génica aberrante (Hou *et al*, 2014). Sin embargo en estos estudios no definieron a las MSCs de acuerdo a los criterios establecidos por la ISCT y por lo tanto aún la presencia de estas

células en la dermis está por definirse. Más aún no se ha descrito la presencia de MSCs en epidermis.

El conjunto de datos reportados por la literatura y lo encontrado previamente por nuestro grupo de trabajo (Castro-Manreza *et al*, 2015; Montesinos *et al*, 2009), nos llevó a preguntarnos cuales son las características biológicas de las MSCs provenientes de la dermis y epidermis de la piel de pacientes con psoriasis, en particular aquellas relacionadas con su morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación y más aún saber si son comparables con aquellas de individuos sanos. Por lo tanto, en el presente estudio, el primer experimento que realizamos fue la obtención de MSCs provenientes de pacientes con psoriasis e individuos sanos.

Los resultados obtenidos fueron: dermis sano (DS) 100%, dermis no lesión (DNL) 90%, dermis lesión (DL) 95%, epidermis sano (ES) 100%, epidermis no lesión (ENL) 14% y epidermis lesión (EL) 75% (Tabla 1). Con estos primeros resultados corroboramos que, tanto la piel de individuos sanos como la de pacientes con psoriasis, son una fuente de MSCs. Es importante señalar que los grupos de trabajo que han analizado las MSCs provenientes de piel no han realizado un estudio comparativo a fondo, dado que solo han aislado a las células sin realizar una separación entre las capas que conforman la piel, dermis y epidermis, o solo han utilizado una de las capas de la piel para la obtención de las células. Asimismo, los trabajos previos no han publicado el porcentaje de obtención de MSCs y no realizan una comparación con las MSCs obtenidas de individuos sanos. (Cerqueira *et al*, 2016; Chang *et al*, 2015).

Adicionalmente, resulta interesante que en la epidermis de la zona sin lesión (ENL) de los pacientes con psoriasis, el porcentaje de obtención sea del 14%, el cual es menor en comparación con lo obtenido en las otras muestras. Lo anterior, posiblemente esté relacionado con un proceso de migración de las MSCs hacia las zonas de lesión debido al proceso inflamatorio que se presenta en la piel, dado que se sabe que el incremento en quimiocinas y citocinas proinflamatorias, ejercen quimioatracción de las MSCs hacia los tejidos dañados y al ser ENL una zona sin lesión activa en el momento de la obtención de la biopsia, posiblemente las MSCs no hayan migrado aun al sitio dañado (Bidkhorri *et al*, 2016; Eseonu *et al*, 2015). Aunque con este argumento no se está justificando el porqué, en comparación con las MSCs obtenidas de individuos sanos, se presenta esta disminución en el porcentaje de obtención. Posiblemente esto sea debido a lo publicado anteriormente por Chang y su grupo de trabajo, donde mencionan que las células mesenquimales obtenidas de la biopsias de piel de pacientes con psoriasis, están presentando un comportamiento aberrante y el proceso de migración e inmunosupresión, no se está presentando desde los inicios de la lesión, como lo haría en un individuo sano y por el contrario, está interviniendo pero de manera negativa, en el proceso inflamatorio característico en las lesiones psoriásicas (Bidkhorri *et al*, 2016; Chang *et al*, 2015; Eseonu *et al*, 2015).

Considerando lo anterior y profundizando respecto a las características de estas células, nos preguntamos si las MSCs obtenidas de la piel, tanto de pacientes con psoriasis como de individuos sanos, comparten características morfológicas similares a las anteriormente descritas por nuestro grupo de trabajo en MO (Montesinos *et al*, 2009).

Por lo tanto, teñimos los cultivos con azul de toluidina, lo cual nos permitió observar las características morfológicas de las MSCs, así como la identificación de tres tipos celulares diferentes presentes en los cultivos (Figura 12).

De lo anterior, en lo que respecta a la morfología de células grandes, obtuvimos diferencias significativas entre ENL ($6.2\pm 2.2\%$) vs DS ($1.3\pm 0.9\%$), DNL ($0.9\pm 1.0\%$), DL ($0.9\pm 0.8\%$), ES ($0.7\pm 0.4\%$) y EL ($0.8\pm 0.3\%$). Por otro lado, en la morfología de células fibroblastoides encontramos diferencias significativas entre las muestras DNL ($2.4\pm 1.6\%$) y DL ($2.6\pm 1.5\%$) vs ENL $13.1\pm 3.0\%$ (Tabla 2).

Tanto nuestro grupo de trabajo como otros grupos de investigación han mencionado que estas características morfológicas le confieren un potencial diferente proliferativo y capacidad de diferenciación a la población de células mesenquimales, siendo las células con morfología fibroblastoide y pequeña, nombrada por nuestro grupo filopodia-filopodia, la poseedora de mayor potencial de autorenovación y diferenciación y por el contrario las células con citoplasma abundante y morfología grande presentan estas capacidades disminuidas (Castro-Manrreza *et al*, 2015; Colter *et al*, 2001; Flores *et al*, 2006; Majore *et al*, 2019; Montesinos *et al*, 2009,). Dado lo anterior, el aumento en el porcentaje de células fibroblastoides (morfología mencionada anteriormente característica de células con alto potencial) en ENL posiblemente se deba a la respuesta normal de las MSCs al inicio de la enfermedad. Por otro lado, se encontró significativamente mayor porcentaje de células grandes en ENL, lo cual nos sugiere del potencial disminuido de las MSCs para realizar sus funciones inmunosupresoras y de

reparación de tejidos, características adecuadas en un individuo sano, lo que podría significar una alteración previa a la aparición de las lesiones psoriásicas.

Una vez que evaluamos la presencia y morfología de las células obtenidas de la piel de pacientes con psoriasis e individuos sanos, nos preguntamos si el inmunofenotipo se relacionaba con el reportado en la literatura para las MSCs o si estaría alterado debido a la enfermedad. Para tal fin empleamos anticuerpos dirigidos contra CD105, CD90, CD73, CD13, HLA-ABC, HLA-DR, CD45, CD34, CD31, CD14, CD13 y CD146 (Figura 13). Respecto a los resultados obtenidos en relación con el inmunofenotipo de las MSCs obtenidas de la piel de pacientes con psoriasis e individuos sanos, se detectó en ambas fuentes la expresión de antígenos descritos para MSCs entre ellos CD105, CD90, CD73 y CD13, así como la nula expresión de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 y CD146 y endoteliales como CD31 (Tabla 3) (Castro-Manrreza *et al*, 2014; Castro-Manrreza *et al*, 2015; Dominici *et al*, 2006; Montesinos *et al*, 2009).

Interesantemente observamos diferencias significativas en la expresión de HLA-ABC entre las distintas muestras (Tabla 3, Grafica 1).

Cabe mencionar que la mayoría de la base genética de la enfermedad psoriásica reside en la región HLA ya que, estudios previos sobre el genoma han demostrado la asociación entre la psoriasis y el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC, por sus siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*) particularmente con los alelos HLA-B27 y HLA-Cw6 (presente en un 30-50% de los pacientes con psoriasis, en comparación con el 10-15% de individuos sanos), los cuales son aceptados como los principales

descriptores de los tipos de psoriasis más comunes y las enfermedades cardiovasculares que desencadena. La predisposición genética determinada por HLA-Cw6 y otros componentes del MHC vendría dada por la pérdida de tolerancia frente a autoantígenos epidérmicos, por lo tanto, posiblemente esta alteración genética se vea reflejada a nivel de las MSCs afectando las capacidades inmunes de las células obtenidas de pacientes con psoriasis (Queiro *et al*, 2016; Budu *et al*, 2016; Puig *et al*, 2014).

Por otra parte, se determinó la capacidad de diferenciación de las MSCs hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico después de haberlas cultivado bajo condiciones de inducción.

Respecto a la capacidad de diferenciación adipogénica, las MSC de piel formaron adipocitos con vacuolas lipídicas, las cuales fueron positivas a la tinción con rojo oleoso en todas las muestras. Con ayuda del microscopio pudimos observar mayor positividad en las células provenientes a dermis, tanto de individuos sanos como de pacientes con psoriasis, en comparación con los encontrados en las MSCs provenientes de epidermis, sobre todo en las epidermis sano y epidermis no lesión, las cuales muestran una menor cantidad de células con vacuolas lipídicas y con morfología característica de adipocitos (Figura 13).

En general, esta capacidad de diferenciación encontrada en piel sana coincide con lo encontrado anteriormente por otros grupos de trabajo, en donde células provenientes de individuos sanos presentan capacidad de formar vacuolas lipídicas en presencia de medio inductor aunque, no se había realizado un estudio comparativo entre las distintas capas, como lo son dermis y epidermis, así como de las MSCs provenientes de piel de

individuos sanos y pacientes con psoriasis (Al-Nbaheen *et al*, 2013). Sin embargo, nuestros resultados son cualitativos, por lo que en próximos trabajos se tendría que buscar un método para determinar cuantitativamente el potencial de diferenciación presentado por todas las muestras y determinar claramente si esta capacidad varia significativamente entre los cultivos a causa de la enfermedad.

Por otra parte, se observó actividad de osteoblastos y depósitos de calcio en todos los cultivos celulares, incluso en ausencia de medio inductor. En cuanto a la tinción con Von Kossa, se observó mayor presencia de depósitos de calcio en los cultivos de dermis en comparación con MSCs obtenidas de epidermis, esta disminución fue más notable en los cultivos de MSCs provenientes de epidermis no lesión y epidermis lesión. Este resultado coincide con lo encontrado en la tinción para detectar la enzima fosfatasa alcalina, un fuerte indicador de actividad producida por osteoblastos (Tham *et al*, 2016), en las cuales también se observa una disminución notable en las muestras de epidermis, especialmente en la muestra de epidermis no lesión, la cual demuestra poca positividad a la presencia de esta enzima. Cabe resaltar que estos resultados son novedosos, dado que otros grupos de trabajo han realizado experimentos similares, pero no han sido tan detallados, al analizar la dermis y la epidermis en conjunto de individuos sanos y no de manera independiente como se realizó en el presente trabajo, en donde también se incluyeron pacientes con psoriasis (Figura 14, 15).

En referencia a lo encontrado en las MSCs provenientes de dermis y epidermis, que fueron inducidas al linaje condrogénico, podemos mencionar que todas las muestras

tuvieron la capacidad de crecer en micromasa y diferenciarse hacia condrocitos, detectando su actividad mediante la tinción con azul alciano (Figura 16). Cabe mencionar que, en las micromasas provenientes de dermis, tanto de individuos sanos como de pacientes con psoriasis, se observó una mayor formación de fibrocartílago (compuesto de cartílago tipo I), revelada por la tinción de tricrómico de Masson, la cual mostró mayor intensidad de tonos azules mientras que en epidermis se observó tanto formación de fibrocartílago como hialocartílago, (compuesto de cartílago tipo II), al observar una distribución heterogénea en los tonos revelados al analizar bajo el microscopio la tinción (Figura 17).

Estudios anteriores habían demostrado el potencial de diferenciación de las MSCs provenientes de piel (Lee *et al*, 2015) pero este es el primer estudio que muestra diferencias respecto al tipo de cartílago producido por las MSCs tanto de individuos sanos como de pacientes con psoriasis, así como el análisis individual de las capas que la conforman, dermis y epidermis. A pesar de lo anterior, es importante señalar que las micromasas obtenidas en cada una de las fuentes son considerablemente más pequeñas que las obtenidas, previamente por nuestro grupo de trabajo, en MSCs provenientes de MO, esto posiblemente se asocie con uno de los problemas más comunes que presentan los pacientes con psoriasis, que es la degradación de cartílago, una consecuencia común desde los primeros indicios de la enfermedad. En futuros experimentos, se tendría que estudiar el papel que juegan las MSCs en los trastornos ligados a la psoriasis y si su capacidad de diferenciación está relacionada a la presencia de artritis psoriásica (Jeremias *et al*, 2014).

En comparación con lo encontrado previamente en MO por nuestro grupo de trabajo, la capacidad de diferenciación en todas las muestras se ve disminuida, así como también encontramos diferencias visiblemente notables entre la capacidad de diferenciación de las distintas capas de la piel. Posiblemente esto se deba a las funciones intrínsecas de las MSCs, ya que se ha encontrado que las MSCs de piel presentan mejor capacidad de diferenciación hacia el linaje adipogénico en comparación con el osteogénico y condrogénico lo que sugiere la presencia de un linaje *impresa*, lo cual se refiere a las diferentes capacidades encontradas en las MSCs según la fuente de las que sean obtenidas. Por otro lado, en relación a pacientes con psoriasis posiblemente esta capacidad no solo se vea alterada por la función *impresa* dada por el sitio en el que se encuentra la MSCs sino por factores asociados a la propia alteración del microambiente en piel (Chang *et al*, 2015; Al-Nbaheen *et al*, 2013). Es importante mencionar que la capacidad de diferenciación fue analizada cualitativamente, lo cual nos da paso a continuar con este estudio y en futuros experimentos analizar la capacidad de diferenciación con un método que nos permita comparar de manera cuantitativa entre las células de todas las fuentes y qué papel está jugando esta capacidad de las células en la enfermedad.

IX. CONCLUSIONES.

- Se obtuvieron MSCs de la piel de pacientes con Psoriasis e individuos sanos, contribuyendo así, a la caracterización biológica de estas células de una manera comparativa a partir de ambas fuentes, epidermis y dermis provenientes, tanto de individuos sanos como de pacientes con psoriasis, lo cual, no solo confirma que la piel es una fuente de MSCs, si no que podemos obtener estas células de las distintas capas que la conforman.
- Se encontraron subpoblaciones celulares morfológicamente características de las MSCs diferentes en los cultivos de las células obtenidas de piel de pacientes con psoriasis e individuos sanos, las cuales posiblemente cumplan funciones distintas en el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad.
- Al analizar la expresión de los antígenos de superficie de las MSCs, se encontraron diferencias significativas en la expresión del MHC I, el cual podría estar jugando un papel determinante en la psoriasis.
- En este estudio se encontró una baja capacidad de diferenciación en todas las muestras, comparado con lo previamente publicado en MSCs de MO por nuestro grupo de trabajo, sin embargo, nuestros resultados hasta el momento fueron cualitativos.

X. PERSPECTIVAS.

- Basados en nuestros resultados, sería interesante clonar células de los diferentes tipos morfológicos a partir de ambas fuentes y analizar sus características biológicas por separado, para así, encontrar alguna posible relación entre la morfología, el potencial biológico y alteraciones de las MSCs.
- También se encontraron células de tamaño grande y respecto a esto, en algunos trabajos se ha publicado que es señal de un bajo potencial de diferenciación y senescencia. Tomando en cuenta estas referencias y de acuerdo a nuestros resultados, sería interesante realizar cinéticas de proliferación de las células grandes, así como las de morfología fibroblastoide y las pequeñas para analizarlas de manera comparativa además sería necesario analizar también el potencial de proliferación entre las células, a partir de las distintas fuentes. Al respecto, ningún grupo de investigación ha publicado nada, siendo nuestro grupo el primero en describir alteraciones en la morfología celular de las MSCs provenientes de pacientes con psoriasis.
- Se sabe ampliamente la relevancia biológica de las diferencias significativas observadas en la expresión de este marcador, relacionado estrechamente con el desarrollo de la psoriasis, por lo cual sería interesante analizar a profundidad los resultados encontrados en el presente estudio, cultivando MSCs de ambas fuentes y analizar su potencial inmunosupresor o bien inmunogénico. También, el estudio de cinética de población planteado anteriormente, nos ayudaría a saber si MHC I tiene correlación con su capacidad proliferativa.

- Estudios posteriores a nivel molecular, como la detección de transcritos característicos de linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico mediante PCR en tiempo real son necesarios para determinar cuantitativamente dicho potencial.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Aggarwal S, M Pittenger. (2005). ***Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses.*** Blood 105:1815-1822.
2. Bidkhorji H, N Ahmadiankia, MM Matin, A Heirani-Tabasi, M Farshchian, H Naderi-Meshkin, M Shahriyari, M Dastpak, A Bahrami. (2016). ***Chemically primed bone-marrow derived mesenchymal stem cells show enhanced expression of chemokine receptors contributed to their migration capability.*** Iranian Journal of Basic Medical Sciences 19:14-9
3. Boehncke W-H., S Boehncke, A-M Tobin, B Kirby. (2011). ***The ‘psoriatic march’: a concept of how severe psoriasis may drive cardiovascular comorbidity.*** Experimental Dermatology 20:303–307.
4. Brunt K., R Weisel, R-K Li. (2012). ***Stem cells and regenerative medicine - future perspectives.*** Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 90:327–335.

5. Budu-Aggrey A, J Bowes, A Barton. (2016). ***Identifying a novel locus for psoriatic arthritis.*** The Journal of Rheumatology 55:25-32.
6. Campanati A, M Orciani, S Gorbi, F Regoli, R Di Primo, A Offidani. (2012). ***Effect of biologic therapies targeting tumour necrosis factor- α on cutaneous mesenchymal stem cells in psoriasis.*** British Association of Dermatologists 167:68–76
7. Castro M, H Mayani, A Monroy, E Flores, K Chávez, V Legorreta, E Santiago, J Montesinos. (2014). ***Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells.*** Stem Cells Development 23:1217–1232.
8. Castro M., J Montesinos. (2015). ***Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications.*** Journal of Immunology Research 2015:394917.
9. Chang W, X Niu, R Hou, J Li, R Liu, Q Wang, C Wang, X Li, G Yin, K Zhang. (2015). ***LITAF, HHEX, and DUSP1 expression in mesenchymal stem cells from patients with psoriasis.*** Genetics and Molecular Research 14:15793-15801.

10. Clop A, A Bertoni, S Spain, M Simpson, V Pullabhatla, R Tonda, C Hundhausen, P Di Meglio, P De Jong, A Hayday, F Nestle, J Barker, R Bell, F Capon, Trembath. (2013). ***An in-depth characterization of the major psoriasis susceptibility locus identifies candidate susceptibility alleles within an HLA-C enhancer element.*** PloS One 8:e71690.

11. Colter D, I Sekiya, D Prockop. (2001). ***Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells.*** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98:7841–7845

12. Dominici M, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, F Marini, D Krause, R Deans, A Keating, DJ Prockop, E Horwitz. (2006). ***Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.*** Cytotherapy 8:315–317.

13. Dunphy S, C Gardiner. (2011). ***NK cells and psoriasis.*** Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011:10.

14. Engela A, C Baan, F Dor, W Weimar, M Hoogduijn. (2012). ***On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation.*** *Frontiers in Immunology* 3:126.

15. Eseonu O, C De Bari. (2015). ***Homing of mesenchymal stem cells: mechanistic or stochastic? Implications for targeted delivery in arthritis.*** *Rheumatology* 54:210-218.

16. Fitzpatrick, T. (2009). ***Dermatología en medicina general.*** Editorial Médica Panamericana.

17. Flores E, J Montesinos, H Mayani. (2006). ***Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica.*** *Revista de Investigación Clínica* 58:498–511.

18. Forni M, M Trombetta-Lima, M Sogayar. (2012). ***Stem cells in embryonic skin development.*** *Biological Research* 45:215-222.

19. Golpanian S, A Wolf, K Hatzistergos, J Hare. (2016). ***Rebuilding the damaged heart: mesenchymal stem cells, cell-based therapy, and engineered heart tissue.*** Physiological Reviews Published. 96:1127-1168
20. Griffiths C, J Barker. (2007). ***Pathogenesis and clinical features of psoriasis.*** The Lancet Journals 370:263-271.
21. Hou R, H Yan, X Niu, W Chang, P An, C Wang, Y Yang, X Yan, J Li, R Liu, X Li X, K Zhang. (2014). ***Gene expression profile of dermal mesenchymal stem cells from patients with psoriasis.*** Journal of European Academy of Dermatology and Venereology 28:1782-1791.
22. Hsu Y., L Li, E Fuchs. (2014). ***Emerging interactions between skin stem cells and their niches.*** Nature Medicine 20:847-856.
23. Jeremias Tda, R Machado, S Visoni, M Pereima, D Leonardi, A Trentin. (2014) ***Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: potential tool for skin regeneration.*** PLoS ONE 9:e89542.

24. Kalluri R. (2016). ***The biology and function of fibroblasts in cancer.*** Nature Reviews Cancer 16:582-598
25. Le Blanc K, D Mougiakakos. (2012). ***Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system.*** Nature Reviews Immunology 12:383–396.
26. Liu R, J Li, R Hou, R Wang, K Zhang. (2015). ***Impact of BMMSCs from different sources on proliferation of CD34⁺ cells.*** Genetics and Molecular Research 14:474-482.
27. Lotfinegad P, K Shamsasenjan, A Movassaghpour, J Majidi, B Baradaran. (2014). ***Immunomodulatory nature and site specific affinity of mesenchymal stem cells: A hope in cell therapy.*** Advanced Pharmaceutical Bulletin 4:5–13.
28. Majore I, P Moretti, R Hass, C Kasper. (2009). ***Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord.*** Cell Communication and Signaling 20:6.

29. Mayani, H. (2011). ***A 50 años del descubrimiento de las células troncales hematopoyéticas.*** Revista de Hematología 12:5-6.
30. Mayani, H. (2003). ***A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance.*** Archives of Medical Research. 34:3–15.
31. McDonald I, M Connolly, AM Tobin. (2012). ***A review of psoriasis, a known risk factor for cardiovascular disease and its impact on folate and homocysteine metabolism.*** Journal of Nutrition and Metabolism 2012:4.
32. Mohd A, A Sukari. (2015). ***Vital roles of stem cells and biomaterials in skin tissue engineering.*** World Journal of Stem Cells 7:428-436.
33. Montesinos J, E Flores, S Castillo, P Flores, E Hernández, G Fajardo, S Orozco, H Mayani. (2009). ***Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression.*** Cytotherapy 11:163–176.

34. Nestle F, P Di Meglio, J Qin, B Nickoloff. (2009). ***Skin immune sentinels in health and disease.*** Nature Reviews Immunology 9:679–691.
35. Nograles K, B Davidovici, J Krueger. (2010). ***New insights in the immunologic basis of psoriasis.*** Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery 29:3-9.
36. Orciani M, A Campanati, E Salvolini, G Lucarini, G Di Benedetto, A Offidani, R Di Primio. (2011). ***The mesenchymal stem cell profile in psoriasis.*** British Journal Dermatology 165: 585–592.
37. Owen M, A Friedenstein. (1988). ***Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors.*** Ciba Foundation Symposium 136:42–60.
38. Park K. (2015). ***Role of micronutrients in skin health and function.*** Biomolecules and Therapeutics 23:207-217.
39. Pelayo R, J Santa-Olalla, I Velasco. (2011) ***Células troncales y medicina regenerativa.*** Dirección general de publicaciones de fomento editorial, Universidad Nacional Autónoma de México.

40. Popp F, P Renner, E Eggenhofer, P Slowik, E Geissler, P Piso, H Schlitt, M Dahlke. (2009). ***Mesenchymal stem cells as immunomodulators after liver transplantation.*** Liver Transplantation 15:1192-1198.
41. Puig L, A Julià, S Marsal. (2014). ***Psoriasis: bases genéticas y patogenéticas.*** Actas Dermosifiliográficas 105:535-545.
42. Queiro R, I Morante, I Cabezas, B Acasuso. (2016). ***HLA-B27 and psoriatic disease: a modern view of an old relationship.*** Rheumatology 55:221-229.
43. Roberson E, A Bowcoc. (2010). ***Psoriasis genetics: breaking the barrier.*** Trends in Genetics 26:415-423.
44. Ross M, W Pawlina. (2007). ***Histología Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular.*** Editorial Medica Panamericana, 5ta Edición. España.

45. Sabat R, S Philipp, C Höflich, S Kreutzer, E Wallace, K Asadullah, H Volk, W Sterry, K Wolk. (2007). ***Immunopathogenesis of psoriasis***. Experimental Dermatology 16:779-798.
46. Sanchez J, S Song, F Cardozo, C Hazzi, T Stedeford, A Willing, T Freeman, S Saporta, W Janssen, N Patel, D Cooper, P Sanberg. (2000). ***Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro***. Experimental Neurology 164:247–256.
47. Scharadin T, R Eckert. (2014). ***TIG3: an important regulator of keratinocyte proliferation and survival***. Journal of investigative dermatology. 134:1811-1816.
48. Siegel G, T Kluba, U Hermanutz-Klein, K Bieback, H Northoff, R Schäfer. (2013). ***Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells***. BioMed Central 11:146.
49. Tham A, C Gandhimathi, J Praveena, J Venugopal, S Ramakrishna, S Kumar. (2016). ***Minocycline loaded hybrid composites nanoparticles for mesenchymal stem cells differentiation into osteogenesis***. International Journal of Molecular Sciences 17:1222.

50. Tay S, B Roediger, P Tong, S Tikoo, W Weninger. (2014). ***The Skin-Resident Immune Network***. Current Dermatology Reports 3:13-22.
51. Teven C, X Liu, N Hu, N Tang, S Kim, E Huang, K Yang, M Li, J Gao, H Liu, R Natale, G Luther, Q Luo, L Wang, R Rames, Y Bi, J Luo, H Luu, R Haydon, R Reid, T He. (2011). ***Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation***. Stem Cells International 2011:18.
52. Till J, E McCulloch. (1961). ***A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells***. Radiation Research Society 14:213-222.
53. Trento C, F Dazzi. (2010). ***Mesenchymal stem cells and innate tolerance: biology and clinical applications***. Swiss Medical Weekly 140:w13121.
54. Villaseñor J, D Wheeler, L Grandinetti. (2012). ***Psoriasis: evolving treatment for a complex disease***. Cleveland Clinic Journal of Medicine 79:413–423.

55. Williams A, J Hare. (2011). ***Mesenchymal Stem Cells Biology, Pathophysiology, Translational Findings, and Therapeutic Implications for Cardiac Disease.*** Circulation Research 109:923–940.
56. Wong, R. (2011). ***Mesenchymal Stem Cells: Angels or Demons?*** Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011:8.
57. Visscher M, V Narendran. (2014). ***The ontogeny of skin.*** Advances in Wound Care. 3:291-303.
58. Zhang K, G Yin, X Li, X Niu, R Hou, R Liu, J Li. (2012). ***Psoriasis and Stem Cells.*** Intech 1:3-8.
59. Satomura K, P Krebsbach, P Bianco, P Gehron-Robey. (2000). ***Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation.*** Journal of Cellular Biochemistry 78:391–403.