



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**MIGRACIÓN IN VITRO DE CÉLULAS LINFOIDES INNATAS
CD123 Y CD127 PROVENIENTES DE SUJETOS SANOS EN
RESPUESTA AL FACTOR 1 DERIVADO DEL ESTROMA (SDF-1) Y
LA PROTEÍNA 3 INFLAMATORIA DEL MACRÓFAGO (MIP-3)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

CRISTINA NAYELI AGUILAR FLORES



Ciudad Universitaria, CDMX., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Enrique Ortega Soto**

VOCAL: **Profesor: Luz María Mora Velandia**

SECRETARIO: **Profesor: Octavio Castro Escamilla**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Enrique De León Lara**

2° SUPLENTE: **Profesor: Luis Angel Flores Mejía**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ) DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES BERNARDO SEPÚLVEDA EN EL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

ASESOR DEL TEMA:

CDR. OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

SUSTENTANTE

CRISTINA NAYELI AGUILAR FLORES

ÍNDICE

Índice de figuras.....	1
Abreviaturas.....	3
Resumen.....	4
Introducción.....	6
Antecedentes.....	9
• Células Linfoides Innatas.....	9
• Migración de las ILC.....	12
• ILC en la piel.....	16
• Quimiocinas.....	17
○ CXCR4 y SDF-1.....	19
○ CCR6 y MIP-3a.....	21
Antecedentes directos.....	23
Justificación.....	26
Hipótesis.....	27
Objetivo general.....	27
• Objetivos particulares.....	27
Materiales.....	28
Métodos.....	30
Resultados.....	36
Discusión de resultados.....	61
Conclusiones.....	72

Referencias.....73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión de moléculas involucradas en la trans migración de leucocitos	13
Figura 2. Estructura y funcionamiento de Receptores acoplados a proteínas G	18
Figura 3. Identificación de las poblaciones ILC CD123 ⁺ y CD127 ⁺ en Sangre Periférica	23
Figura 4. Identificación de las poblaciones ILC CD123 ⁺ y CD127 ⁺ en Dermis sana	24
Figura 5. Expresión de CXCR4 y CCR6 en las poblaciones celulares ILC CD123 ⁺ e ILC CD127 ⁺ de Sangre periférica	25
Figura 6. Movilización de la población ILC CD123 ⁺ de sangre periférica en respuesta a SDF-1	26
Figura 7. Purificación de las poblaciones ILC CD123 ⁺ y CD127 ⁺ provenientes de sangre periférica mediante citometría de flujo	38
Figura 8. Movilización de Células ILC CD123 ⁺ y CD127 ⁺ purificadas utilizando un esferoide de células estromales	39
Figura 9. Aumento de la expresión de CD127 en células purificadas CD123 ⁺ no migrantes de esferoide	41
Figura 10. Movilización de las poblaciones ILC CD123 ⁺ y CD127 ⁺ en respuesta a SDF-1 en presencia de células HUVEC	42
Figura 11. La población ILC CD123 ⁺ se moviliza en respuesta a SDF-1	44
Figura 12. Inmunofenotipo ILC1, ILC2 e ILC3 en las poblaciones ILC CD123 ⁺ y CD127 ⁺	45
Figura 13. Porcentaje de la población ILC CD123 ⁺ con inmunofenotipo de ILC1, ILC2 o ILC3	47
Figura 14. Expresión de CD127 en población CD123 ⁺ proveniente de Células Mononucleares de Sangre Periférica	49

Figura 15. Porcentaje de la población ILC CD127 ⁺ con inmunofenotipo de ILC1, ILC2 o ILC3	50
Figura 16. Movilización de las poblaciones ILC CD123 ⁺ y CD127 ⁺ en respuesta a MIP3 α en presencia de células HUVEC	52
Figura 17. Las poblaciones ILC CD123 ⁺ y CD127 ⁺ se movilizan en respuesta a MIP-3 α	53
Figura 18. Porcentaje de la población ILC CD123 ⁺ con inmunofenotipo de ILC1, ILC2 o ILC3	54
Figura 19. Expresión de CD127 en población ILC CD123 ⁺ proveniente de Células Mononucleares de Sangre Periférica	55
Figura 20. Porcentaje de la población ILC CD127 ⁺ con inmunofenotipo de ILC1, ILC2 o ILC3	57
Figura 21. Movilización de Células ILC CD123 ⁺ purificadas en respuesta a SDF-1	59
Figura 22. Expresión de CD127 en ILC CD123 ⁺ purificadas provenientes de sangre periférica	60

ABREVIATURAS

ASB	Albúmina Sérica Bovina
CCR6	Receptor 6 de quimiocinas CC
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
CD123	Clúster de Diferenciación 123 (cadena alfa de IL-3R)
CD127	Clúster de Diferenciación 127 (cadena alfa de IL-7R)
CD161	Clúster de Diferenciación 161
c-Kit	Proteína Tirosina Kinasa Kit
CLA	Antígeno Linfocitario Cutáneo
CRTH2	Receptor de Prostaglandina D2
CXCR4	Receptor 4 de quimiocinas CXC
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
HLA-DR	Antígeno Leucocitario Humano clase DR
HUVEC	Células Endoteliales de la Vena del Cordón Umbilical
ILC	Célula linfoide innata
IL-3	Interleucina 3
LIN ⁻	Linaje negativo
LT	Linfocito T
MIP-3 α	Proteína 3 alfa Inflamatoria del Macrófago (CCL20)
Rpm	Revoluciones por minuto
SDF-1	Factor 1 derivado del estroma (CXCL12)
SFB	Suero Fetal Bovino
SP	Sangre periférica
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa

Resumen

Las Células Linfoides Innatas (ILC) han emergido como una nueva población efectora del sistema inmune las cuales se ha descrito son importantes en infecciones por microorganismos así como en procesos inflamatorios crónicos. Dicha población se encuentra descrita en sangre periférica y otros tejidos. Se caracteriza por ser una población linaje negativa de morfología linfoide, carece de $\text{TCR}\alpha\beta$ o BCR, expresa citocinas y factores de transcripción similares a los de un linfocito T cooperador y expresa en superficie el marcador CD127 ($\text{IL-7R}\alpha$)¹. Adicionalmente, en nuestro grupo de trabajo encontramos una población en sangre periférica y piel que cumple con los criterios característicos de una ILC pero se distingue por la expresión de CD123 ($\text{IL-3R}\alpha$). Las ILC provienen de un precursor linfoide común (CLP) presente en medula ósea, el cual madura en dicho órgano hacia un precursor comprometido a ILC denominado precursor de Células Linfoides Innatas (ILCp). Experimentos realizados en ratón proponen que el ILCp sale a sangre periférica y posteriormente se dirige a tejidos periféricos donde ejerce sus funciones efectoras como son la producción de citocinas. En humano las ILC CD127⁺ han sido relacionadas con la progresión de enfermedades inflamatorias como psoriasis, dermatitis atópica, enfermedad de Crohn y alergias. Sin embargo muy poco se conoce acerca de los mecanismos por los que estas células son capaces de migrar desde SP hacia tejidos. Se ha descrito la presencia de algunos receptores de quimiocinas que podrían conferir tropismo a estas células, por ejemplo, las ILC CD127⁺ de intestino expresan CXCR3 y CXCR6²; en piel se ha

descrito la expresión de los receptores CXCR3, CXCR5 y CXCR6². Además, en nuestro laboratorio se describió la expresión de otros marcadores de tropismo a piel tales como el Antígeno Linfocitario Cutáneo (CLA), CXCR4 y CCR6 en las poblaciones ILC CD127⁺ e ILC CD123⁺, lo cual sugiere que ambas podrían tener el potencial de redistribuirse de sangre periférica a piel.

En este trabajo se evaluó la movilización y cambios fenotípicos de las poblaciones ILC CD123⁺ e ILC CD127⁺ frente a los estímulos quimiotácticos Factor 1 Derivado del Estroma (SDF-1) y Proteína **3α Inflamatoria de Macrófagos** (MIP-3α), los cuales son ligandos de CXCR4 y CCR6 respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que existe una migración diferencial entre las ILC CD123⁺ y CD127⁺, las ILC CD123⁺ se movilizan en respuesta a los estímulos SDF-1 y MIP-3α mientras que la población ILC CD127⁺ se moviliza ante un estímulo de MIP-3α. Además se observan cambios en el inmunofenotipo de ambas poblaciones al interaccionar o cruzar una monocapa de células endoteliales.

Introducción

La primer línea de defensa contra infecciones está a cargo de células y moléculas pertenecientes a la inmunidad innata, la cual se encuentra en un estado funcional completo antes de encontrarse con agentes patógenos, previo al desarrollo de las respuestas adaptativas. Las Células Linfoides Innatas (ILC) forman parte del sistema inmune innato y sus características principales son: 1) Proviene de un precursor linfoide común (CLP), 2) poseen una morfología linfoide, 3) carecen de marcadores clásicos de células T, B, monocitos, NKs, polimorfonucleares y células dendríticas, por lo que son consideradas como linaje negativas, 4) no poseen receptores antígeno específico, 5) Comparten la expresión de citocinas y factores transcripcionales con los Linfocitos T cooperadores y 6) expresan CD127⁺ (IL-7R).

El origen y desarrollo de las ILC se ha estudiado en modelos de ratón, en donde se ha descrito que su desarrollo se inicia en el hígado fetal y posteriormente en la médula ósea a partir de un Progenitor Linfoide Común (CLP) que expresa CD127. Se propone también que las ILC abandonan la médula ósea siendo una célula precursora denominada Precursor ILC (ILCp), la cual migra y concluye su maduración en tejidos². Dependiendo de sus características fenotípicas, expresión de factores de transcripción, así como las citocinas que son capaces de secretar, las ILCs se han dividido en tres grupos.

Las ILC1 presentan un fenotipo Lin⁻ CD127⁺CD161⁺, expresan el factor de transcripción T-bet y se activan en presencia de IL-12, IL-15 e IL-18 con la

producción de IFN- γ ¹. En humano se ha reportado el incremento de esta población en pacientes con enfermedad de Crohn³.

El grupo ILC2 con fenotipo Lin⁻ CD127⁺CRTH2⁺IL-33R⁺, expresa GATA3 y responde a las citocinas IL-25 e IL-33 con la producción de IL-4, IL-5 e IL-13¹. En humano se ha descrito su capacidad para producir anfirregulina a nivel transcripcional⁴, lo que sugiere su probable participación en la remodelación pulmonar. También se ha reportado su incremento en pacientes con dermatitis atópica, rinosinusitis crónica, asma y fibrosis pulmonar idiopática⁴.

El grupo ILC3 se caracteriza por la expresión del factor de transcripción ROR- γ t. Presenta un fenotipo Lin⁻ CD127⁺c-Kit⁺IL-23R⁺ y expresa las citocinas IL-17 y/o IL-22 en respuesta a IL-**1 β** y a IL-23¹. Se ha encontrado que el número y cantidad de citocinas producidas por este subgrupo está incrementado en pacientes con psoriasis, en tumores de pacientes con cáncer de colon asociado a colitis, en lavados bronco alveolares de pacientes con asma así como en tejido intestinal de individuos con Enfermedad Inflamatoria Intestinal⁴.

Lo anterior muestra que diferentes poblaciones de ILC se han observado en órganos como pulmones, piel e intestinos de pacientes con enfermedades inflamatorias, sin embargo poco se sabe de los mecanismos de redistribución que poseen estas células homeostáticamente. Se ha propuesto, en modelos murinos, que parte de la maduración de estas células se lleva a cabo en médula ósea y que salen hacia sangre periférica como ILCp el cual expresa la integrina **α 4 β 7** y los

receptores CCR9 y CXCR6⁵ los cuales median la migración de estos precursores hacia órganos periféricos.

Además se ha reportado que su presencia y diferenciación en ILC efectoras en órganos periféricos depende de su estimulación con citocinas homeostáticas o citocinas inflamatorias provistas por el microambiente, así como de vías de señalización activadas de manera órgano-específica². La expresión de receptores de quimiocinas que les proporcionan tropismo a estas células es un tema de reciente investigación. En humano se han reportado a los receptores CCR5, CXCR3, CXCR5, y CXCR6² como candidatos para mediar su movilización hacia intestinos y piel, sin embargo se desconoce si otros receptores de quimiocinas pueden estar mediando su migración y si estos receptores son funcionales en respuesta a sus ligandos.

Antecedentes

Células Linfoides Innatas

Las Células Linfoides Innatas (ILC) son una población celular de reciente descripción que forma parte de la respuesta inmune innata. Son definidas por su morfología linfoide, falta de receptores específicos a antígenos, no expresa marcadores de linaje específicos como Linfocitos T, B, monocitos, células NK, polimorfonucleares o células dendríticas y de manera importante, son capaces de producir citocinas clásicas de LT cooperadores¹.

Se ha reportado que para su desarrollo y mantenimiento dependen de la cadena **γ común del receptor de citocinas** (CD132) y de la señalización a través de **la cadena α del receptor de IL-7** (CD127). Además expresan otros marcadores como **CD25 (Cadena α del receptor de IL-2)**, CD45 (Antígeno Común Leucocitario), CD90 (Thy-1) y CD161 (receptor de lectinas de células NK)¹.

La ontogenia de las ILC se ha estudiado principalmente en ratón, se reporta que ésta inicia en el hígado fetal y posteriormente en la médula ósea del organismo adulto en donde se lleva a cabo la maduración de un Progenitor Linfoide Común (CLP: Lin⁻ Id2⁻ IL-7Ra⁺ **α4β7⁻** Flt3⁺). Experimentos en los que CLP se transfieren a ratones Rag^{-/-}IL2rg^{-/-} demuestran que este precursor da origen tanto a linfocitos linaje positivo (Linfocitos T y B) como linaje negativo⁶.

Posteriormente la maduración del CLP a un precursor comprometido al linaje ILC ocurre mediante la expresión del represor transcripcional Id2, este precursor se denomina Precursor Común de ILC tipo Cooperador o CHILP el cual presenta el

fenotipo $\text{Lin}^- \text{Id2}^+ \text{CD127}^+ \text{CD25}^- \alpha 4\beta 7^+$. Se ha observado que el CHILP no expresa los factores de transcripción maestros T-bet, ROR- γ t o GATA-3, sin embargo es capaz de dar origen a tres subgrupos de ILC posteriormente descritos⁶.

Recientemente se ha propuesto que el CHILP continúa su maduración en médula ósea y da paso a un Precursor de ILC (ILCp: $\text{Lin}^- \text{CD127}^+ \text{PLZF}^+ \text{TOX}^+ \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{Flt3}^- \alpha 4\beta 7^+$)^{7,8} el cual es capaz de abandonar la médula ósea y migrar hacia sangre periférica y finalmente a tejidos periféricos donde concluye su maduración². Sin embargo la presencia de ILCp que expresan algunos de los factores de transcripción característicos de una ILC completamente diferenciada como GATA3⁹ y T-bet⁶ en médula ósea y en sangre periférica¹⁰ ha llevado a proponer la existencia de precursores específicos (ILC1p, ILC2p e ILC3p) para cada subgrupo, los cuales tienen que llegar a tejidos periféricos para convertirse en una ILC madura.

Una ILC madura se activa en respuesta a citocinas del microambiente celular producidas por el epitelio u otras células inmunes, como las células dendríticas⁴. Dependiendo del patrón de producción de citocinas, así como de la expresión de ciertos factores de transcripción se ha podido clasificar a las ILC en tres grupos.

Células Linfoides Innatas del grupo 1: ILC1 ($\text{Lin}^- \text{CD127}^+ \text{C-Kit}^- \text{CRTH2}^-$)

El grupo de las ILC1 responde a un estímulo de IL-12, IL-15 e IL-18 con la producción de IFN- γ , siendo regulada positivamente por la expresión del factor de transcripción T-bet. También se ha descrito que las ILC1 pueden llegar a expresar bajos niveles de ROR- γ t³ y carecen de CD117 (c-Kit).

Se ha clasificado a las células NK dentro del grupo de las ILC1. Estas células se han descrito como ILC citotóxicas productoras de perforinas y granzimas además de citocinas como IFN- γ . Las NK son importantes en la respuesta inmune contra células tumorales y células infectadas por virus¹.

Células Linfoides Innatas del grupo 2: ILC2 (Lin⁻CD127⁺C-Kit⁻CRTH2⁺)

Las ILC2 se caracterizan por la producción de IL-4, 5 y 13 aunque también se ha descrito que pueden producir IL-6 e IL-9¹¹. La producción de estas citocinas se da en respuesta a un estímulo con IL-25, IL-33 y Linfopoyetina Estromal Tímica (TSLP)¹. Su desarrollo y mantenimiento es dependiente del factor de transcripción GATA3 y además expresan el Receptor de Prostaglandina D2 (CRTH2).

Células Linfoides Innatas del grupo 3: ILC3 (Lin⁻ CD127⁺C-Kit⁺CRTH2⁻)

Las ILC del grupo 3 producen IL-17 e IL-22 en respuesta a un estímulo de IL-**1 β** y de IL-23; dependen del factor de transcripción ROR- γ t y **expresan CD117** en su superficie¹. Se ha propuesto que la producción de IL-17 por parte de este grupo de ILC induce la producción de péptidos anti-microbianos y citocinas que participan en la inmunidad contra patógenos extracelulares, mientras que la IL-22 promueve funciones de reparación de tejido⁴.

Migración de las ILC

Se define como migración celular a los procesos involucrados en el movimiento de una célula de un lugar anatómico a otro como respuesta a señales espacio-temporales, específicas y coordinadas, las cuales generan una polarización, adhesión y translocación celular^{12, 13}. La migración de una célula comienza en respuesta a estímulos del medio (quimiocinas) que pueden estar solubles o adheridos a la matriz extracelular. La activación de receptores quimiotácticos conduce a la polarización interna de la célula formando protuberancias, también llamadas lamelipodios^{12, 13, 14}.

Se propone que el desarrollo de las ILC se lleva a cabo en médula ósea sin embargo, su presencia en diversos tejidos periféricos sugiere que son necesarios procesos de tropismo, migración y extravasación que les permitan salir de médula ósea y llegar a sangre periférica o a los diferentes tejidos periféricos⁴. Este proceso de extravasación comprende una serie de interacciones con las células endoteliales (CE) que desembocan en el paso de los leucocitos entre las uniones que presenta el endotelio, este movimiento se denomina diapedésis o transmigración paracelular, la cual se ha descrito como la ruta predominante en la migración de leucocitos hacia tejidos periféricos¹².

La transmigración comienza con un primer contacto de los leucocitos con la célula endotelial, seguido por un rodamiento sobre la pared del vaso sanguíneo donde participan las selectinas expresadas en los leucocitos y moléculas expresadas en el endotelio como GlyCAM, CD34, E-selectina y P-selectina^{15,16, 17}.

Después las integrinas (moléculas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas) expresadas en las CE y en los leucocitos participan en el arresto de las células al endotelio. Posteriormente el leucocito atraviesa la capa endotelial y la membrana subendotelial mediado por moléculas de adhesión como PECAM, CD99, JAM y la cadherina del endotelio vascular. Una vez atravesadas estas capas los leucocitos son capaces de movilizarse hacia el tejido perivascular^{15, 18}.

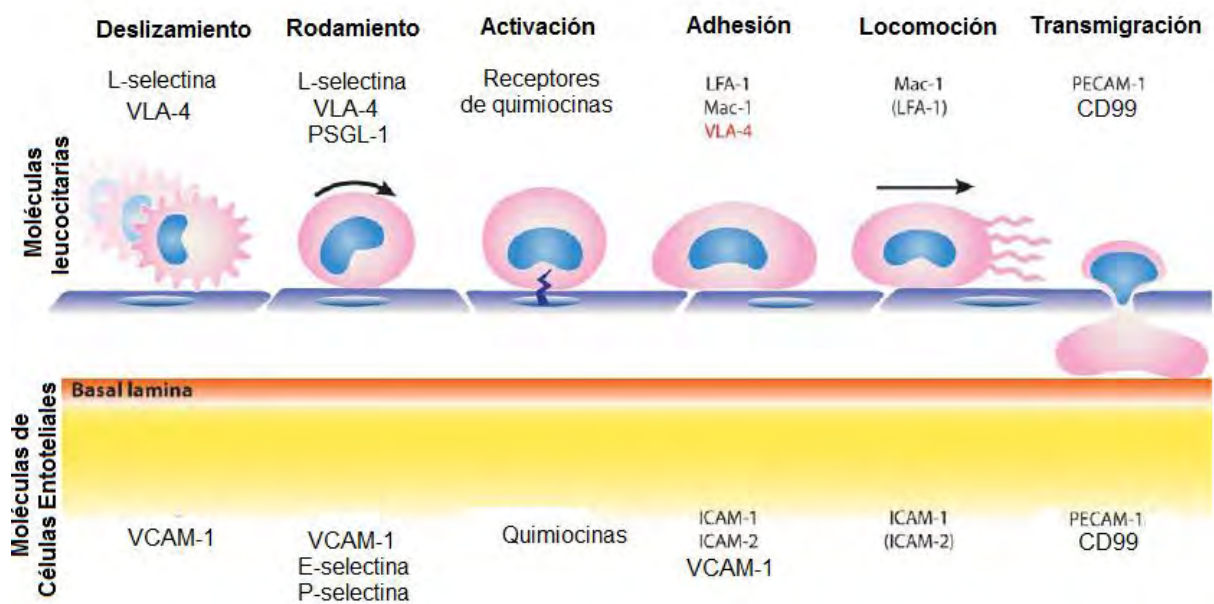


Figura 1. Expresión secuencial de moléculas involucradas en la trans migración de leucocitos. Modificada de Getting leukocytes to the site of inflammation W. A. Muller¹².

En la literatura se sugiere que las ILC se distribuyen de SP a tejidos, donde terminan su maduración. También se menciona que su localización es específica para cada sub grupo². Por ejemplo, las ILC1 son la población dominante en el epitelio intestinal mientras que las ILC2 predominan en los pulmones, lamina propia del intestino delgado y en piel. Finalmente, las ILC3 se encuentran

colonizando principalmente intestinos². Esta distribución en los diversos órganos podría estar dirigida por la expresión de receptores de tropismo.

Los receptores de tropismo pueden ser receptores de quimiocinas o integrinas expresados en las células los cuales regulan la migración celular. En el ILCp se han descrito diferentes receptores de tropismo que permiten la adhesión a los vasos sanguíneos y la migración desde médula ósea hacia la periferia como son la integrina $\alpha 4\beta 7$, el receptor CXCR6 y CCR9².

MAdCAM-1 es una molécula de adhesión celular vascular la cual es el ligando principal de $\alpha 4\beta 7$ y es altamente expresada en células endoteliales activadas¹⁹. CXCR6 regula la migración linfocitaria a hígado, intestino, pulmones y piel, mientras que CCR9 es importante en la movilización hacia intestino delgado⁵.

Una vez fuera de médula ósea, la maduración, cantidad y distribución de las ILC dependen de la presencia de citocinas hematopoyéticas (IL-7) e inflamatorias (IL-15, IL-18, IL-1 β , etc.), nutrientes y de señales del microambiente² de los diferentes tejidos en que se encuentren, ya sea en condiciones basales o en presencia de algún patógeno.

Se han encontrado ILC maduras en tejidos linfoides secundarios como en nódulos linfáticos mesentéricos, en donde se ha observado que la migración de ILC1 e ILC3 requiere de la activación del receptor CCR7²⁰. De manera interesante se ha descrito que las ILC maduras y algunos ILCp tienen la capacidad de cambiar receptores de tropismo cuando ya se encuentran en órganos periféricos. Experimentos realizados en ratón muestran que las ILC3 de bazo expresan CCR7, y bajo una activación con IL-7 y ácido retinoico provoca la regulación a la baja de

este receptor y promueve la expresión de CCR9 y de $\alpha 4\beta 7$. Posterior a la activación de estas células se observó que migraron de manera eficiente hacia intestinos²⁰.

Los receptores de tropismo que se han descrito en ILC provenientes de humano se encuentran resumidos en la **Tabla 1**. Sin embargo se desconoce si estos receptores son funcionales en respuesta a sus quimiocinas activadoras, si la movilización de la población ILC y sus sub grupos hacia tejidos periféricos depende de la expresión de sólo un receptor de tropismo, de varios receptores simultáneos o si existen más receptores por ser descritos.

Receptores de tropismo en ILC maduras descritas en humano			
	Intestino	Piel	Pulmón
ILC1	CXCR3 CXCR6	CXCR3	ND
ILC2	CXCR5 CXCR6 CRTH2	CRTH2 CLA CCR4 CCR10	CRTH2
ILC3	ND	CLA	ND

Tabla1. Receptores de tropismo descritos en ILC. Se muestran los receptores de tropismo reportados en humano. ND, no determinado. Modificado de Migration and Tissue Tropism of Innate Lymphoid Cells Chang H. Kim²

Debido a que las ILC han sido asociadas a patologías inflamatorias crónicas en humano como psoriasis y dermatitis atópica, uno de los tejidos en los que se ha abocado el estudio de las ILC es la piel. Se ha reportado que en sujetos sanos ésta población expresa los receptores de tropismo CLA, CCR4 y CCR10² y se propone que en condiciones inflamatorias, el aumento en la expresión de estos receptores contribuye al incremento de su frecuencia en este órgano, sin embargo

poco se conoce de los mecanismos involucrados en la migración homeostática de las ILC a piel.

ILC en la piel

La piel es la barrera física principal que concede protección contra el medio ambiente. Además posee mecanismos físicos, biológicos y químicos que le confieren un papel sumamente activo en la defensa contra organismos patógenos²¹. Mecanismos de defensa, así como mecanismos de tolerancia deben estar en constante equilibrio para mantener la integridad de este órgano. La correcta funcionalidad de la respuesta inmune en piel está a cargo de varios tipos de células inmunes: células de Langerhans, Células Dendríticas Dermales, macrófagos, Linfocitos Th1, Th2 y Th17, Linfocitos T $\gamma\delta$, **Células** NKT y de reciente descripción las ILC²².

Poco se sabe del papel de las ILC en condiciones homeostáticas, sin embargo se ha reportado que las ILC2 son el subgrupo dominante en piel y que estas expresan los receptores de tropismo CLA, CCR4 y CCR10²³. La presencia incrementada así como su desregulación pudieran contribuir al desarrollo de enfermedades inflamatorias en piel. Se ha reportado un incremento en la frecuencia de las ILC2 en piel lesionada de pacientes con Dermatitis Atópica en comparación con biopsias de piel sana²⁴. También se observó que las ILC2 en estos pacientes incrementan la expresión de los receptores de IL-33 y TSLP lo que sugiere que podrían responder de manera desregulada²³. Por otro lado se ha descrito en pacientes con psoriasis que la población ILC3 puede ser una de las

principales fuentes de IL-22 e IL-17. Además esta población se encuentra incrementada en biopsias de piel lesionada y no lesionada en estos pacientes en comparación con biopsias de piel sana²⁵. Las ILC1 son una población de poca frecuencia en piel y su función en patologías dermales es poco conocida, sin embargo se ha propuesto que podrían contribuir al desarrollo de dermatitis alérgica por contacto²⁶.

Sin embargo, a pesar de que se ha descrito la presencia en piel de los diferentes grupos de ILC, algunas de sus funciones así como patologías en las que se han visto relacionadas, las moléculas (quimiocinas y receptores de quimiocinas) que participan en su redistribución de sangre periférica hacia este tejido han sido poco estudiadas.

Quimiocinas

Las quimiocinas son un tipo de citocina que induce la movilización de leucocitos en respuestas inflamatorias y de inmunovigilancia²⁷. Actúan regulando la migración desde sangre periférica hacia tejidos mediante un gradiente de concentración. Se ha descrito su importancia en procesos biológicos como la organogénesis fetal, el mantenimiento de la arquitectura tisular, angiogénesis así como en la maduración de células inmunes²⁸. Se puede clasificar a las quimiocinas dependiendo de su función y de sus características estructurales. En cuanto a sus características estructurales, las quimiocinas son agrupadas en cuatro familias dependiendo de cómo se encuentran distribuidos cuatro residuos de cisteína en la estructura primaria²⁸.

La familia de quimiocinas CC se compone de 28 miembros reportados (CCL1 a CCL28) y presentan dos cisteínas adyacentes cerca del extremo amino terminal. La segunda familia CXC compuesta por 17 miembros (CXCL1 a CXCL17) presenta los residuos cisteínas n-terminales separadas por un aminoácido. La familia CX₃C se compone de un sólo ligando llamado CX₃CL1 y presenta tres aminoácidos entre las dos cisteínas n-terminales. Por último la familia XC está compuesta por dos miembros: XCL1 y XCL2, posee sólo un residuo de cisteína precedido por un aminoácido²⁸.

Las quimiocinas llevan a cabo su función biológica por medio de la unión con sus receptores, los cuales están acoplados a proteínas G, esto quiere decir que son receptores transmembranales de siete asas acoplados a proteínas heterotriméricas (α , β , γ)²⁸.

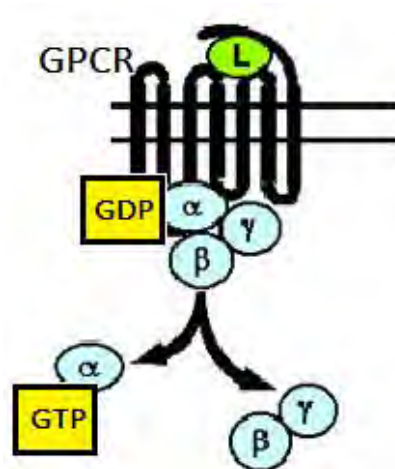


Figura 2. Estructura y funcionamiento de Receptores acoplados a proteínas G

La unión del ligando al receptor promueve la unión de GTP, esto permite la **separación del trímero en un dímero $\beta\gamma$ y en el monómero α** el cual activa diferentes cascadas de señalización que conducen a diferentes procesos: expresión de proteínas de adhesión, estallido respiratorio, fagocitosis y quimiotaxis²⁹.

La otra clasificación de las quimiocinas se basa en la función que lleven a cabo sobre leucocitos. Se definen tres grupos diferentes de quimiocinas, las quimiocinas inflamatorias promueven el reclutamiento de células inmunes efectoras en un contexto de infección, inflamación o daño tisular y tienen su función en células del sistema inmune innato y adaptativo. Las quimiocinas homeostáticas controlan la movilización de leucocitos durante la hematopoyesis y promueven una vigilancia inmunológica funcional en todos los órganos y tejidos periféricos. Por último, las quimiocinas de función dual participan en el montaje de una respuesta inmune aumentando su expresión en condiciones inflamatorias, siendo importantes en el desarrollo y maduración de precursores y leucocitos maduros en un contexto de vigilancia inmune²⁸.

CXCR4 y SDF-1

CXCR4 es un receptor altamente conservado en diferentes especies de bovinos, murinos e incluso peces en los que se comparte una alta homología con la proteína humana²⁹. El gen que codifica la expresión de este receptor se localiza en el cromosoma humano 2q21 y la proteína está constituida por 352 aminoácidos y es específico para la quimiocina SDF-1³⁰. Es expresado por gran variedad de células hematopoyéticas (Linfocitos T, Linfocitos B, monocitos, neutrófilos,

eosinófilos) y no hematopoyéticas como células endoteliales, neuronas, microglía y astrocitos³⁰. Se ha descrito que la disrupción en la expresión de CXCR4 es letal en el desarrollo embriológico en modelos murinos²⁹.

La transcripción del mRNA que codifica para CXCR4 es regulado positivamente por la expresión del Factor 1 Respiratorio Nuclear (NRF-1) así como por el aumento en la expresión de segundos mensajeros como calcio intracelular y AMP cíclico. También se ha reportado que la presencia de IL- 2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15 así como Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) aumenta la transcripción del mensajero, mientras que citocinas inflamatorias como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β disminuyen la expresión de CXCR4³¹. La interacción de CXCR4 con su ligando promueve la activación de vías de señalización río abajo (PI3K, Akt, ERK, FAK) que de manera pleiotrópica, culmina en respuestas quimiotácticas, proliferación, incremento de calcio intracelular y transcripción de genes asociados con supervivencia celular como RAS, p38 y Erk^{30, 31}.

El Factor 1 Derivado de Células Estromales (SDF-1) o CXCL12 es el ligando específico de los receptores CXCR4 y CXCR7. Es considerado como una quimiocina homeostática³⁰ involucrada en procesos de diferenciación, activación y tráfico celular. Se encuentran reportados seis isómeros constitutivos funcionales: α , β , γ , δ , ϵ y ϕ los cuales tienen una distribución diferencial en pulmón, hígado, músculo esquelético, cerebro, riñones, corazón, médula ósea (MO) y piel³². Se ha reportado que SDF-1 es importante en el periodo de gestación, donde regula el tráfico celular hematopoyético así como la arquitectura de tejidos linfoides secundarios, corazón, cerebro y sistema vascular³³.

Además de las funciones descritas, el eje CXCR4/SDF-1 también tiene efectos sobre el sistema inmune. Por ejemplo, se ha descrito que la expresión de CXCR4 se incrementa cuando el Linfocito T es activado mediante la presentación de antígeno, y que esta expresión permite la asociación física con otros receptores de quimiocinas como CCR5 para aumentar la migración y función efectora del LT³⁴. En células dendríticas derivadas de médula ósea así como en células dendríticas cutáneas se ha descrito que la expresión de CXCR4 aumenta su migración y funcionalidad en piel³⁵. Por otro lado, se ha reportado que la activación del eje SDF-1/CXCR4 activa la quimiotaxis de basófilos así como el aumento de la liberación de histamina³⁶. Lo anterior sugiere que el papel de CXCR4 y la unión a su ligando es importante para el movimiento, maduración e incluso activación en células inmunes.

CCR6 y MIP-3 α

CCR6 es el receptor específico para la quimiocina Proteína 3 alfa Inflamatoria del Macrófago. El gen que codifica la expresión de este receptor se encuentra en el cromosoma 6q27 y la proteína codificada consta de 368 aminoácidos³⁷. Se ha encontrado la expresión del RNA mensajero en varios tejidos como bazo, nódulos linfáticos, apéndice e hígado. En leucocitos se encuentra en Células Dendríticas, Linfocitos T CD4, CD8 así como en Linfocitos B. También se ha reportado que en neutrófilos CCR6 aumenta su expresión bajo el estímulo de IL-2 y TNF- α ²⁹ mientras que IFN- γ induce niveles bajos del mensajero³⁸.

La Proteína 3 alfa Inflamatoria del Macrófago (MIP-3 α), también denominada CCL20 es una quimiocina constitutiva, la cual es importante en la inducción de la migración de células inmunes hacia tejido linfoide (bazo y nódulos linfáticos), no linfoide (apéndice, páncreas, intestino delgado) y hacia sangre periférica^{39,40}. Sin embargo experimentos en ratones CCR6^{-/-} muestran que la ausencia de esta quimiocina no causa anormalidades importantes en la organogénesis ni en el desarrollo de poblaciones leucocitarias³⁷. Se ha reportado a MIP-3 α como una quimiocina de función dual, es decir que actúa bajo condiciones inflamatorias y también promueve respuestas homeostáticas y de vigilancia inmunológica con el movimiento de células no efectoras, precursores celulares y leucocitos maduros no activados²⁸.

CCL20 se expresa en la superficie de células epiteliales bronquiales, intestinales y en queratinocitos⁴⁰. También se ha encontrado *In vivo* RNA mensajero de MIP-3 α expresado de manera constitutiva y en bajas concentraciones en epidermis humana de personas sanas⁴¹. Se ha observado que la expresión de la proteína dirige la migración de células dendríticas inmaduras y linfocitos T efectores y de memoria hacia tejido cutáneo. Además, los queratinocitos pueden incrementar de manera importante la producción de esta quimiocina bajo un estímulo de TNF- α , IL-1 e IL-17⁴⁰. Este incremento también se encuentra reportado bajo condiciones patológicas como psoriasis, dermatitis por contacto y en micosis fungoides³⁷.

Antecedentes directos

En trabajos realizados en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) se determinó la presencia en sangre periférica de una población ILC descrita en la literatura como linaje negativo CD127⁺, que denominaremos como clásicas, así como una población con morfología linfoide, linaje negativa y con un inmunofenotipo parecido a las ILC clásicas pero con expresión de CD123⁴².

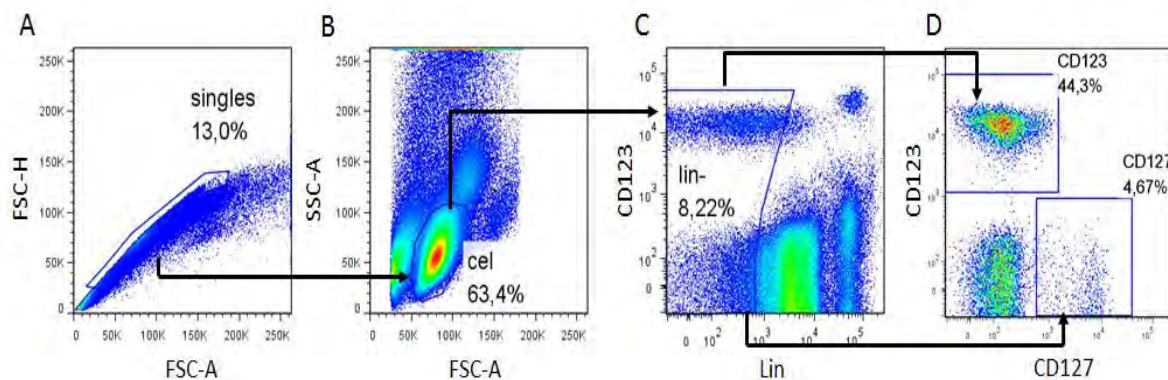


Figura 3. Identificación de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ en Sangre Periférica.

Plots representativos de la estrategia de identificación de las poblaciones ILC provenientes de sangre periférica, obtenidos por citometría de flujo. **A.** Zona de eventos sencillos. **B.** Zona de tamaño y complejidad correspondiente a linfocitos. **C.** Selección de células linaje negativo (Lin: CD3, CD14, CD19, CD94, HLA-DR). **D.** Selección de las poblaciones de interés ILC CD123⁺ e ILC CD127⁺.

De manera interesante, nuestro equipo de trabajo determinó la presencia de poblaciones ILC semejantes a las observadas en sangre periférica en cultivos de dermis de personas sanas. Además se observó que la población ILC CD123⁺ tenía

un cambio fenotípico ya que presentaba un incremento en la expresión del marcador CD127⁺ en comparación con la población de SP⁴².

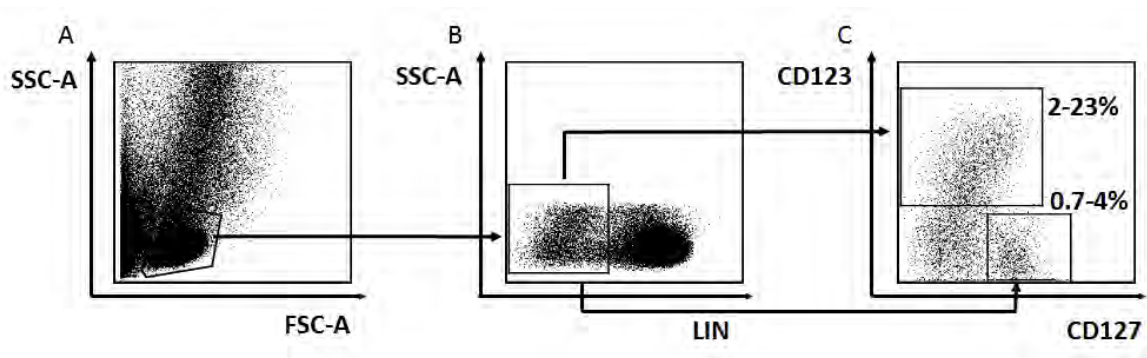


Figura 4. Identificación de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ en Dermis de sujetos sanos. Plots representativos de la estrategia de identificación de las poblaciones ILC provenientes de dermis de sujetos sanos, obtenidos por citometría de flujo. **A.** Zona de tamaño y complejidad correspondiente a linfocitos. **B.** Selección de células linaje negativo (Lin: CD3, CD14, CD19, CD94, HLA-DR). **C.** Selección de las poblaciones de interés ILC CD123⁺ e ILC CD127⁺.

Además al evaluar la expresión de otros marcadores fenotípicos en dichas poblaciones de sangre periférica, se determinó que ambas poblaciones expresan receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR6 los cuales pudieran conferir tropismo a piel. Específicamente encontramos que la población ILC CD123⁺ tiene una mayor expresión de CXCR4 mientras que la población ILC CD127⁺ expresa más el receptor CCR6⁴².

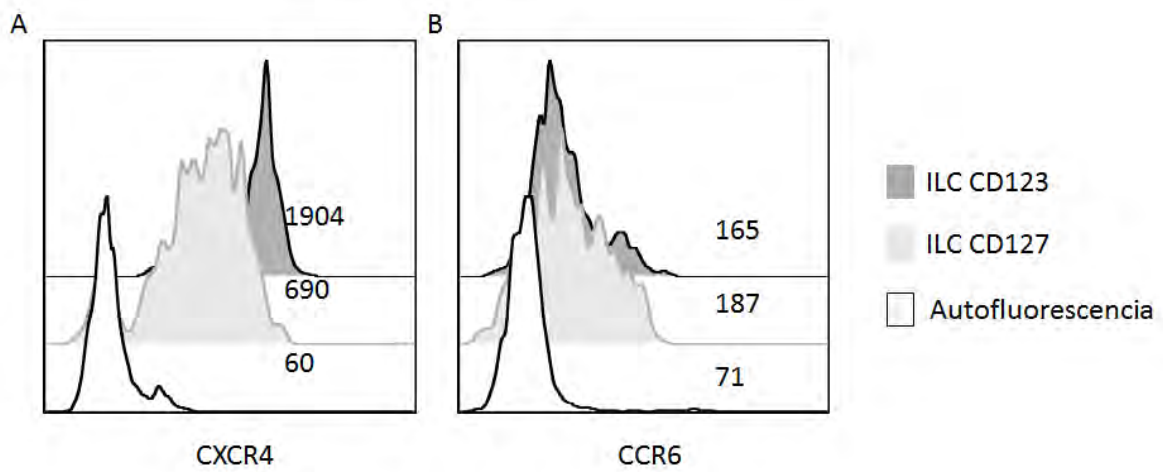


Figura 5. Expresión de CXCR4 y CCR6 en las poblaciones celulares ILC CD123⁺ e ILC CD127⁺ de sangre periférica. Se muestran histogramas representativos de la expresión de **A** CXCR4 y **B** CCR6 en las células ILC CD123⁺ y CD127⁺.

Finalmente en un trabajo previo se evaluó el potencial de movimiento de las ILC CD123⁺ en un sistema de migración Transwell utilizando SDF-1 como estímulo quimioatrayente, observándose que esta población es capaz de movilizarse en respuesta a dicha quimiocina.

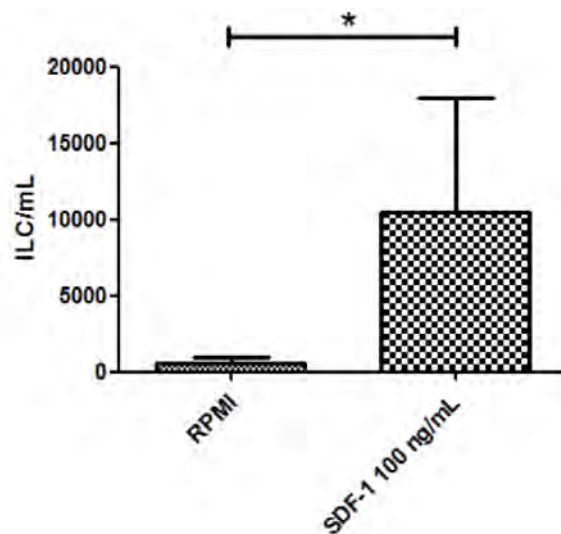


Figura 6. Movilización de ILC CD123⁺ en respuesta a SDF-1. Se realizaron ensayos de migración en pozos Transwell con un estímulo de SDF-1 (100ng/mL). Gráficas construidas a partir de los números absolutos de células migrantes Lin⁻ CD123⁺ obtenidos de cuatro experimentos independientes y después de 3.5 horas de migración. Mann Whitney *p<0.05

Justificación

Los antecedentes citados sugieren que las poblaciones ILC CD123⁺ e ILC CD127⁺ presentes en sangre periférica podrían redistribuirse a piel. Sin embargo desconocemos si esto puede ser mediado por los receptores CXCR4 y CCR6 y si esta movilización puede inducir cambios en el inmunofenotipo en las poblaciones ILC CD123⁺ e ILC CD127⁺.

Hipótesis

Las Células Linfoides Innatas CD123⁺ y CD127⁺ provenientes de sangre periférica serán capaces de movilizarse y de modificar su inmunofenotipo en respuesta a las quimiocinas SDF-1 y MIP3 α .

Objetivo general

Evaluar la movilización y cambios fenotípicos de las células linfoides innatas CD123⁺ y CD127⁺ provenientes de sangre periférica de individuos sanos, en respuesta a los estímulos quimiotácticos SDF-1 y MIP3 α .

Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad de movilización de las ILC CD123⁺ y CD127⁺ purificadas de sangre periférica de individuos sanos en un modelo tridimensional de esferoide productor de SDF-1.
- Determinar la expresión de CD127 en la población CD123⁺ purificada no migrante del esferoide.
- Evaluar la capacidad de movilización de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ provenientes de células mononucleares de sangre periférica, a través de una monocapa endotelial, en respuesta a las quimiocinas SDF-1 y MIP3 α .
- Determinar el inmunofenotipo de las ILC CD123⁺ y CD127⁺ en respuesta a los estímulos quimiotácticos SDF-1 y MIP3 α mediante la expresión de CD161, CRTH2 y c-Kit.

- Evaluar la capacidad de movilización de la población CD123⁺ purificada a través de una monocapa de células endoteliales en presencia de SDF-1 así como la expresión de CD127 en las células migrantes y no migrantes.

MATERIALES

Sangre periférica de individuos control

Se obtuvieron Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) a partir de la fracción leucoplaquetaria de donadores provenientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez, se empleó Lymphosep, Lymphocyte (Biowest) para la separación de las CMSP.

Enriquecimiento de Células Linfoides Innatas CD123⁺ y CD127⁺ mediante Sorting

Para el marcaje de linaje se emplearon los anticuerpos anti-CD3, CD14, CD19, CD94 y HLA-DR conjugados con el fluorocromo PE (BioLegend). Para la selección negativa se emplearon perlas magnéticas anti-PE (Miltenyi Biotec) y columnas de separación LD (Miltenyi Biotec) con buffer MACS como medio para la selección. Realizada la depleción se emplearon los siguientes anticuerpos para el marcaje de superficie: anti-CD123 conjugado con el fluorocromo PECy5 (BioLegend) y anti-CD127 conjugado con Brilliant Violet 421 (BV 421) (BioLegend), se utilizó solución FACS (PBS pH 7.4, suero de caballo al 2% y azida de sodio al 0.05%) para los lavados.

El medio empleado para las células purificadas mediante citometría de flujo fue RPMI 1640 suplementado con Suero Fetal Bovino (BioWest) al 10%, HEPES (BioWest), aminoácidos no esenciales (HyQ MEM), Piruvato de sodio (Gibco), L-glutamina (BioWest), Penicilina (BioWest), Estreptomicina (BioWest), Ciprofloxacino (Altia) y mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).

Experimentos de migración en esferoide de células estromales

Se emplearon dos líneas celulares estromales productoras de SDF-1, una humana (HS-5) y una murina (OP9). Los esferoides se hicieron en pozos con fondo en V recubiertos con Agarosa al 1% a los que posteriormente se agregaron 10,000 células HS-5 u OP9. Los esferoides formados fueron teñidos con CellTrace Violet. Se empleó RPMI como medio en estos ensayos. 10,000 células purificadas ILC CD123⁺ o CD127⁺ marcadas con Carboxifluoresceína (Invitrogen 5nM) se emplearon en estos ensayos así como IL-3 a una concentración de 10µg/mL (Peptotec).

Experimentos de migración en sistema Transwell recubierto con células endoteliales HUVEC

Se colocó una monocapa con 80,000 Células Endoteliales de la Vena del Cordón Umbilical (HUVEC) obtenidas en pase 1 a 5 sobre pozos Transwell (Corning Costar) con tamaño de poro de 5 µm. El medio empleado en estos ensayos fue Endothelial Cell Growth Medium con 2% de SFB y Factor de crecimiento endotelial vascular (EGM-2) (Lonza). Se emplearon como estímulos Factor 1 Derivado del

Estroma (R&D Systems) y Proteína 3 Inflamatoria del Macrófago (Peprotech), ambos a una concentración de 100 ng/mL.

Anticuerpos empleados para la fenotipificación mediante citometría de flujo

Para la fenotipificación de las células migrantes y no migrantes se emplearon los anticuerpos anti-CD3, CD14, CD19, CD94, HLA-DR y CD123 conjugados con el fluorocromo PE (BioLegend). Anti-CD3, CD14, CD19, CD94, HLA-DR conjugados con el fluorocromo FITC (BioLegend). Anti-CD127 conjugado con BV421 (BioLegend), anti-CD161 conjugado con PECy7 (BioLegend), anti-CD117 conjugado con PeCy5 (BioLegend), anti-CRTH2 conjugado con APCCy7 (BioLegend), biotina anti-CRTH2 (BioLegend) y Estreptavidina conjugada con PECy7 (BD Biosciences). Los lavados fueron realizados con solución FACS.

Métodos

Obtención de células mononucleares de sangre periférica provenientes de individuos control

La fracción leucoplaquetaria se diluyó en proporción 1:1 en PBS pH 7.4. Posteriormente se separaron las células mononucleares mediante un gradiente de densidad con Lymphosep, Lymphocyte (Biowest, $\rho = 1.077$) centrifugándose por 30 minutos a 2000rpm. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS a 1500 y 700 rpm por 10 minutos respectivamente, finalmente se resuspendieron en 5 mL de PBS para ser contadas en un hematocitómetro con Azul tripano (Bio Whittaker).

Depleción de células linaje positivas a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante perlas magnéticas

1×10^8 CMSP fueron incubadas con anticuerpos marcados con PE anti-CD3, CD14, CD19, CD94, HLA-DR por 20 minutos a 4°C , transcurrido el tiempo de incubación se realizaron dos lavados a 1500 rpm por 10 minutos con MACS estéril y posteriormente las células se incubaron con las perlas magnéticas anti-PE por 20 minutos a 4°C , nuevamente se realizaron dos lavados con MACS estéril y el botón celular restante se resuspendió con $500\mu\text{L}$ de MACS. La suspensión celular se hizo pasar a través de una columna magnetizada, realizándose una selección negativa, en la cual las células que fueron marcadas con las perlas magnéticas se quedaron adheridas a la columna (Células Linaje positivo). Las células que pasaron por la columna (Linaje negativo) fueron incubadas con anticuerpos anti-CD123 y anti-CD127 por 20 minutos a 4°C . Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron dos lavados a 1500 rpm por 10 minutos con solución de FACS estéril resuspendiéndose el botón celular nuevamente con solución de FACS estéril y ajustándose a una concentración de 3.5×10^6 cel/mL.

Purificación de ILCs CD123⁺ y CD127⁺ por Sort

La separación de células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^-$ y $\text{Lin}^- \text{CD123}^- \text{CD127}^+$ fue llevada a cabo mediante Sorting en un citómetro de flujo FACS Aria II upgrade con pureza promedio de 92.13% y 81.05% respectivamente.

Marcaje de células purificadas ILC CD123⁺ y CD127⁺ con Carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) para ensayos en esferoides

Las células purificadas ILC CD123⁺ y CD127⁺ fueron lavadas con PBS y Albúmina Sérica Bovina (ASB) al 0.1%, posteriormente se resuspendió el botón celular con 1 mL de ASB y se incubó la suspensión celular con CFSE por 10 min a 37°C. Se añadió 1 mL de Suero Fetal Bovino (SFB) y se realizaron dos lavados con ASB, finalmente se resuspendió el botón celular en medio RPMI al 10%.

Migración de células ILC CD123⁺ y CD127⁺ en esferoide de células estromales

10,000 células purificadas ILC CD123⁺ y CD127⁺ purificadas fueron colocadas en pozos que contenían un esferoide productor de SDF-1 suspendido en medio RPMI al 10%. Las condiciones evaluadas en este sistema fueron, para las ILC CD123⁺: sin estímulo y añadiendo IL-3 al medio celular. Para las ILC CD127⁺ sólo se evaluó una condición sin estímulo. Los esferoides junto con las células se dejaron en incubación por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Finalizada la incubación se recolectaron los esferoides y las células no migrantes del sobrenadante. El esferoide se fijó con Cytofix Cytoperm (BD Biosciences) por 24 h a 4°C. Posteriormente se retiró la solución de fijado y se sustituyó por PBS, las células no migrantes se fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 minutos a 4°C. Finalizada la incubación se realizó un lavado de las células en solución de FACS a 1500rpm

por 4 minutos y finalmente las células se resuspendieron en 180 μ L de solución FACS para su posterior tinción.

Microscopía confocal de los esferoides de células estromales en presencia de las poblaciones CD123⁺ y CD127⁺

Las micrografías fueron obtenidas a un aumento de 20x con un microscopio confocal Nikon A1 y analizadas posteriormente con el software ImageJ (NIH).

Migración de células ILC CD123⁺ y CD127⁺ en un sistema Transwell con recubrimiento de células endoteliales HUVEC

2x10⁶ CMSP fueron colocadas en la parte superior del pozo Transwell cuya membrana de policarbonato se recubrió con una monocapa de células endoteliales previamente activadas con TNF- α . En la parte inferior del pozo se agregaron 700 μ L de medio EGM-2 con y sin SDF-1 o MIP-3 α en una concentración de 100ng/mL. Tras 3.5 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂ se realizó el conteo de las células no migrantes y migrantes ubicadas en la parte superior e inferior del pozo respectivamente. Finalmente las células se recuperaron y fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 minutos a 4°C, después de la incubación se realizó un lavado de las células en buffer de FACS a 1500rpm por 4 minutos. Finalmente las células se resuspendieron en 180 μ L de buffer de FACS para su posterior tinción para ser evaluadas mediante citometría de flujo.

Inmunofenotipificación de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ no migrantes y migrantes utilizando el esferoide de células estromales y el sistema Transwell

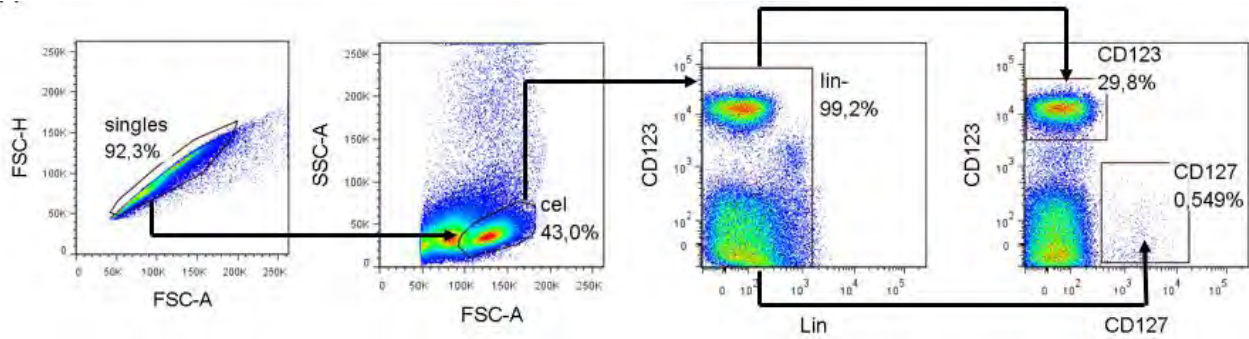
Las células migrantes y no migrantes obtenidas del esferoide y del sistema Transwell fueron resuspendidas en buffer de FACS y colocadas en placas de 96 pozos, se centrifugaron a 1500rpm por 4 minutos y se desechó el sobrenadante. Se resuspendieron en 35µL de la mezcla con los siguientes anticuerpos: para las células no migrantes, purificadas ILC CD123⁺ y CD127⁺ se marcó superficialmente CD123 o CD127, CD161, CRTH2 y NKp44.

Para las CMSP migrantes y no migrantes se realizó una tinción de superficie para los marcadores de linaje CD3, CD14, CD19, CD94 y HLA-DR, así como CD127, CD123, CD161, C-Kit, y CRTH2. Ambas tinciones se incubaron 20 minutos a 4°C y posteriormente fueron lavadas con FACS a 1500 rpm por 4 minutos. Finalmente se resuspendió el botón celular con 180µL de FACS para la evaluación posterior de las células con el citómetro de flujo BD FACS CANTO.

Cálculo de números absolutos de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ migrantes y no migrantes

Los resultados obtenidos de la citometría de flujo fueron analizados en el programa FlowJo (Tree Star Inc.). El algoritmo empleado para obtener los números absolutos de las células migrantes y no migrantes comprende la relación entre el número de células contadas y los porcentajes de las poblaciones de singles, células

en la zona de linfocitos, células linaje negativo y finalmente la zona de ILC CD123⁺ o CD127⁺, como se muestra a continuación:



$$\begin{aligned}
 & \text{Células contadas} * \frac{\% \text{en zona de singles}}{100\%} * \frac{\% \text{en zona de linfocitos}}{100\%} * \frac{\% \text{en zona linaje negativo}}{100\%} * \frac{\% \text{en zona ILC CD123 o ILC CD127}}{100\%} \\
 & = \text{Células ILC CD123 o CD127}
 \end{aligned}$$

Resultados

Identificación y purificación de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺

Con base en el hallazgo de la existencia de poblaciones similares ILC CD123⁺ y CD127⁺ en SP y en dermis, aunado con la expresión diferencial de CXCR4 y CCR6 en estas poblaciones los cuales pueden conferir tropismo a piel, se decidió evaluar la capacidad de movilización de ambas poblaciones celulares en respuesta a las quimiocinas SDF-1 y MIP-3 α .

La identificación de ambas poblaciones celulares en SP se realizó por citometría de flujo mediante una tinción de superficie con distintos anticuerpos. Primero se descartan agregados celulares en el plot de altura contra área, ambas del parámetro de tamaño (**Figura 3A**), a continuación se identifica el área de linfocitos en el plot de complejidad contra tamaño (**Figura 3B**), posteriormente la mezcla de anticuerpos dirigida a células que expresan CD4 (Linfocitos T), CD14 (monocitos), CD19 (Linfocitos B), CD94 (Células NK) y HLA-DR (Células dendríticas) nos permite identificar a las células linaje negativo (**Figura 3C**) y finalmente analizamos las poblaciones de interés de este trabajo: las ILC descritas clásicamente como Lin⁻ CD127⁺ y la población descrita en la UIMIQ como Lin⁻ CD123⁺ (**Figura 3D**).

Movilización de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ purificadas en presencia de un esferoide productor de SDF-1 y aumento en la expresión de CD127⁺.

Tomando en consideración que las ILC CD123⁺ expresan el receptor CXCR4 y que son capaces de movilizarse en respuesta a SDF-1 en un sistema Transwell, se buscó un sistema que pudiera demostrar que estas células tienen la capacidad de movilizarse. Para evaluar el potencial de movimiento de las ILC CD123⁺ y CD127⁺ se emplearon esferoides contruidos con las líneas celulares HS-5 (estromales humanas) y OP-9 (estromales de ratón) ambas productoras de SDF-1. Para ello se realizó la purificación de células linaje negativo provenientes de SP de individuos sanos por medio de un marcaje de células linaje positivo y de una columna de selección negativa. Las células que se obtuvieron en esta selección fueron teñidas superficialmente con anticuerpos anti-CD123 y CD127 y se purificaron mediante citometría de flujo **(Figura 7A y 7B)**.

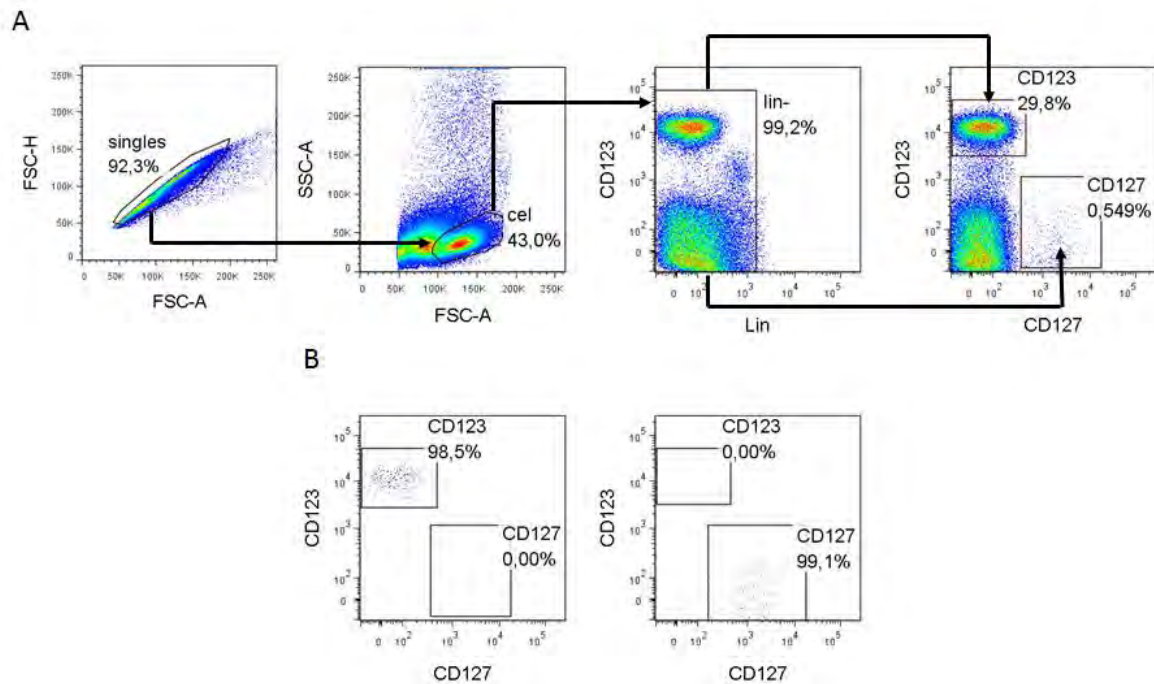


Figura 7. Purificación de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ provenientes de sangre periférica mediante citometría de flujo. Plots representativos del sort realizado para obtener las poblaciones de interés. **A.** Estrategia de identificación de las ILC CD123⁺ y CD127⁺ después de la selección negativa en columna. Se seleccionaron los eventos sencillos del plot de altura contra área, posteriormente se tomó la zona de linfocitos del plot de complejidad contra tamaño, a partir de dicha población se eligió la zona de células lin⁻ y finalmente se seleccionaron las poblaciones CD123⁺ y CD127⁺. **B.** Plots representativos que muestran la pureza de las poblaciones CD123⁺ (izquierda) y CD127⁺ (derecha) obtenidas después de realizado el sort.

Las células ILC CD123⁺ y CD127⁺ purificadas fueron marcadas con Carboxifluoresceína, el cual es un colorante fluorescente que se une a proteínas. Ambas poblaciones fueron adicionadas a un esferoide previamente teñido con CellTrace Violet (CTV) construido con las líneas celulares HS-5 u OP-9 y analizadas por medio de microscopia confocal (**Figura 8A**). Al analizar los esferoides después de 24 horas de incubación, se observa que las células añadidas ILC CD123⁺ (**Figura 8B**) y CD127⁺ (**Figura 8C**) fueron capaces de movilizarse hacia el interior del esferoide.

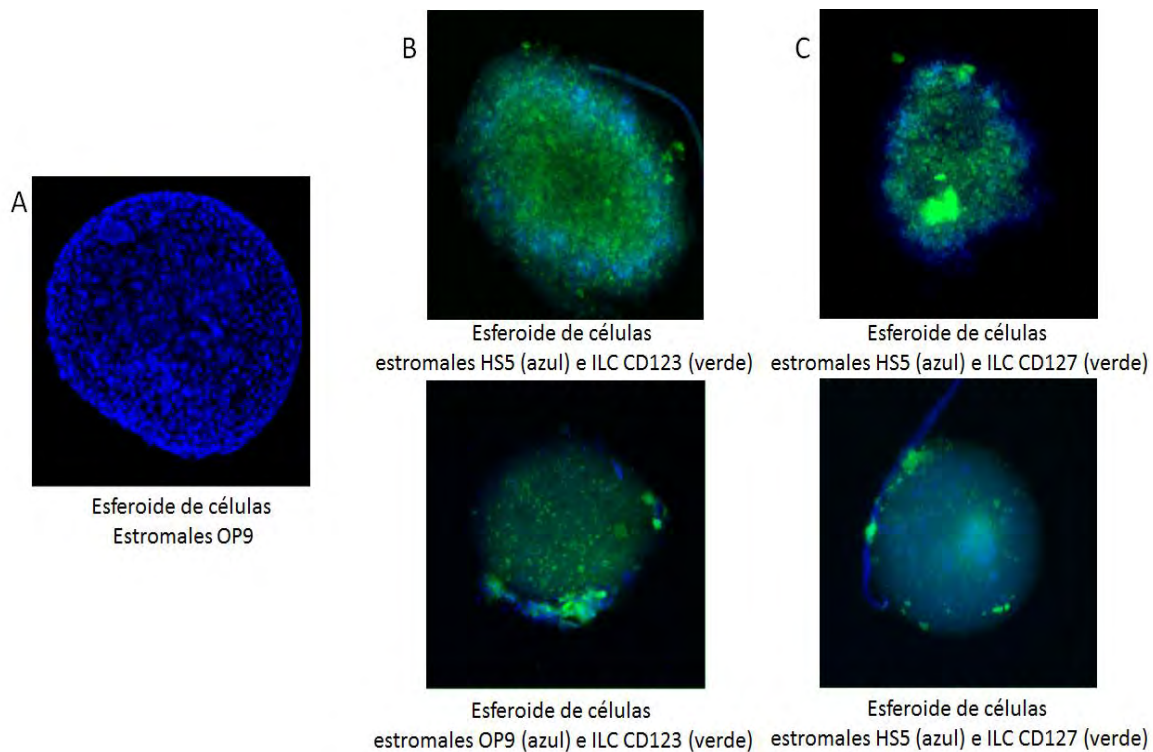


Figura 8. Movilización de Células ILC CD123⁺ y CD127⁺ purificadas utilizando un esferoide de células estromales productoras de SDF-1. Células ILC CD123⁺ y CD127⁺ purificadas fueron teñidas con Carboxifluoresceína (verde) y después adicionadas a un esferoide teñido con CTX (azul) construido a partir de células estromales OP-9 o HS-5 previamente suspendido en agarosa. Se muestran micrografías representativas obtenidas por microscopía confocal con aumento 20x de **A.** Esferoide de células estromales OP-9 productoras de SDF-1. **B.** Esferoides de dos experimentos independientes con células ILC CD123⁺ tras 24h de incubación **C.** Esferoides de dos experimentos independientes con células CD127⁺ tras 24 horas de incubación.

Trabajos previos en nuestro equipo de trabajo sugieren que cuando se encuentra en SP, la población ILC CD123⁺ expresa de manera baja el marcador CD127, y que su expresión aumenta cuando se encuentra en dermis. Por lo tanto, además de analizar la migración de las células también evaluamos los cambios fenotípicos que pudiera tener la población ILC CD123⁺, específicamente la expresión de CD127. Para ello se recolectaron las células presentes en el sobrenadante donde se encontraban inmersos los esferoides y se tiñeron con un anticuerpo anti-CD127 para las células ILC CD123⁺ purificadas y con un anticuerpo

anti-CD123 para las células ILC CD127⁺ purificadas para ser analizadas mediante citometría de flujo.

Se observó que en comparación con el porcentaje de poblaciones ILC CD123⁺ observadas antes de realizar el sort (**Figura 9A**), las células que estuvieron en contacto con el esferoide aumentan la expresión del marcador CD127 estando o no en cultivo con IL-3 (**Figura 9B y 9C**). Debido al resultado anterior se decidió evaluar la expresión de CD127 por medio de su Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) en las células ILC CD123⁺ antes de realizar el sort, después de la purificación y posterior a las 24 h de contacto con el esferoide de células estromales con y sin IL-3 (**Figura 9D**) observándose que la expresión de CD127 en las ILC CD123⁺ antes de ser agregadas al esferoide (pre y post sort) es mínima y que existe un aumento cuando estuvieron en cultivo con el esferoide en ausencia/presencia de IL-3 en el medio. Estos resultados nos muestran que las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ son capaces de movilizarse en un modelo de esferoide productor de SDF-1. Además la población ILC CD123⁺ es capaz de incrementar la expresión de CD127.

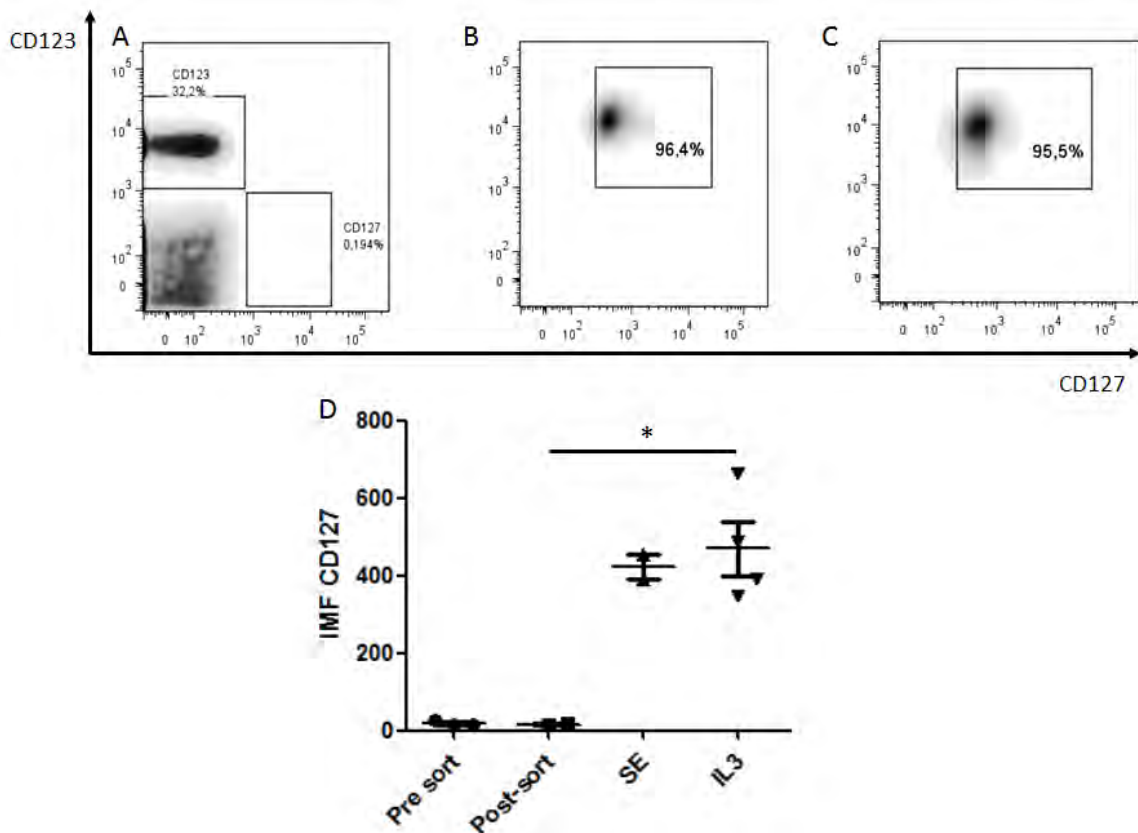


Figura 9. Aumento de la expresión de CD127 en células purificadas CD123⁺ no migrantes de esferoide. Se muestran plots representativos del porcentaje de poblaciones ILC CD123⁺ purificadas. **A.** Plot pre-sort, **B.** Plot de células ILC CD123⁺ purificadas no migrantes después de 24h de incubación con el esferoide, **C.** Plot de células CD123⁺ purificadas no migrantes después de 24h de incubación con el esferoide e IL-3. El inciso **D.** muestra la IMF de CD127 en células ILC CD123⁺ analizadas en diferentes condiciones: pre sort (n=3), purificadas post sort (n=2), purificadas no migrantes de esferoide (SE n=2) y purificadas no migrantes de esferoide con IL-3 (IL-3 n=3). p<0.05

Movilización de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ en respuesta a SDF-1 en presencia de células HUVEC

Tomando en cuenta que se han encontrado ambas poblaciones ILC tanto en SP periférica como en dermis, lo siguiente que se hizo fue evaluar su capacidad de movilización a través de una monocapa endotelial, la cual simularía el tejido endotelial capilar que tendrían que atravesar *in vivo* las poblaciones de ILC para

redistribuirse hacia tejidos periféricos. Para ello se empleó un sistema de migración Transwell el cual consta de dos pozos, el pozo superior fue recubierto previamente con una monocapa de células endoteliales HUVEC mientras que en el pozo inferior se colocó medio EGM con o sin SDF-1 (100ng/mL).

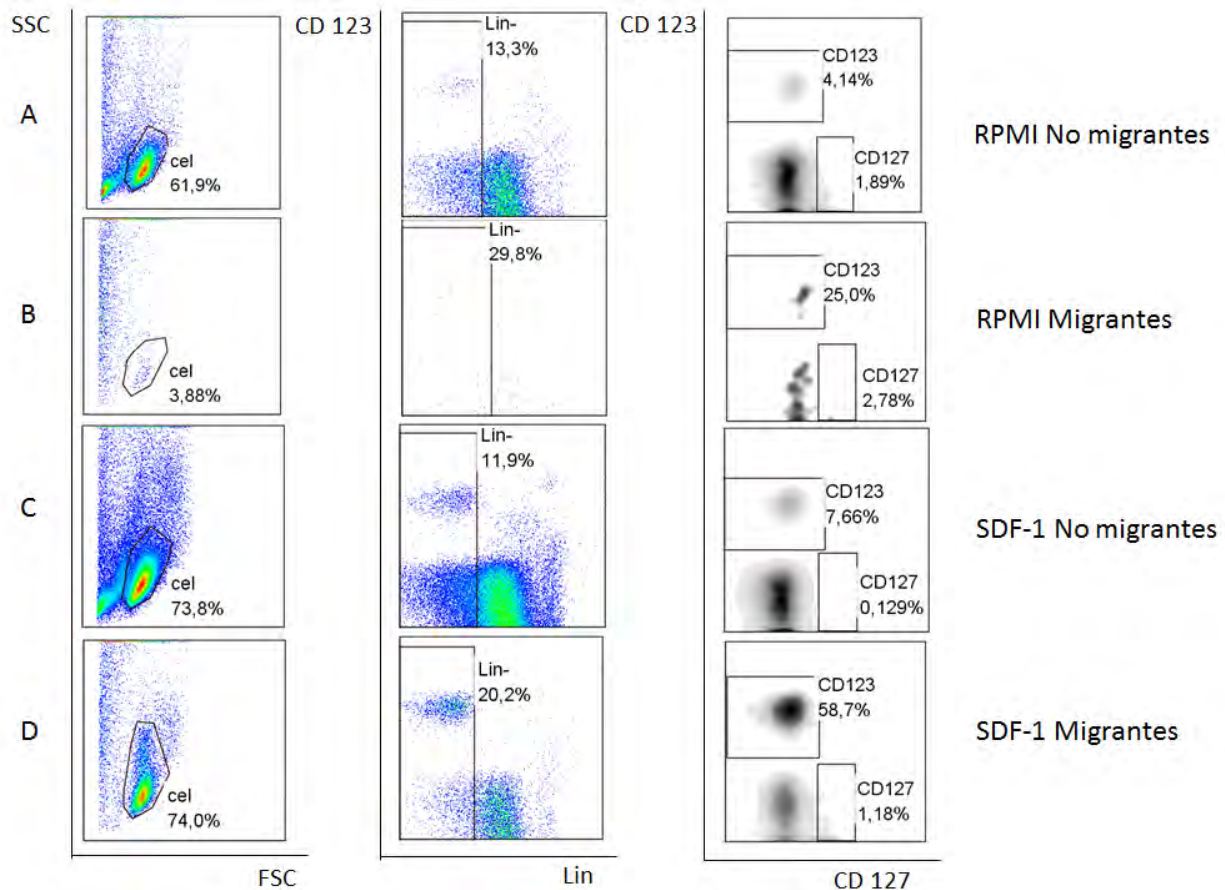


Figura 10. Movilización de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ en respuesta a SDF-1 en presencia de células HUVEC. Plots representativos del porcentaje de células migrantes ILC CD123⁺ y CD127⁺ provenientes de Sangre Periférica en respuesta a SDF-1 (100ng/mL) después de 3.5 horas de migración en pozos Transwell recubiertos con células HUVEC. En los incisos **A.** y **B.** se observan los plots representativos de las células sin estímulo ILC CD123⁺ y CD127⁺ no migrantes y migrantes respectivamente. En los incisos **C** y **D** se muestran los plots representativos de las células ILC CD123⁺ y CD127⁺ no migrantes y migrantes con SDF-1.

Las CMSP fueron colocadas en el pozo superior y después de 3.5 horas de incubación las células migrantes (M) y no migrantes (NM) se recolectaron, contaron, fijaron y se tiñeron para su análisis mediante citometría de flujo.

La **Figura 10** muestra los plots representativos obtenidos por citometría de flujo donde se observa que el porcentaje de poblaciones migrantes ILC CD123⁺ incrementa en respuesta a SDF-1 (**Figura 10D**) en comparación a los pozos que no tenían el estímulo (**Figura 10B**), mientras que la movilización de la población ILC CD127⁺ parece no ser afectada por la presencia de SDF-1. Empleando el número total de células migrantes (M) o no migrantes (NM) y los porcentajes obtenidos de la zona de singles, zona de linfocitos, área de células lin⁻ y finalmente los porcentajes correspondientes a la zona de ILC CD123⁺ o CD127⁺ se obtuvieron los números absolutos de células M y NM de las poblaciones de interés. La **Figura 11** muestra dos gráficas de barras construidas a partir de los números absolutos de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ migrantes y no migrantes, después de realizar seis experimentos y diez repeticiones independientes.

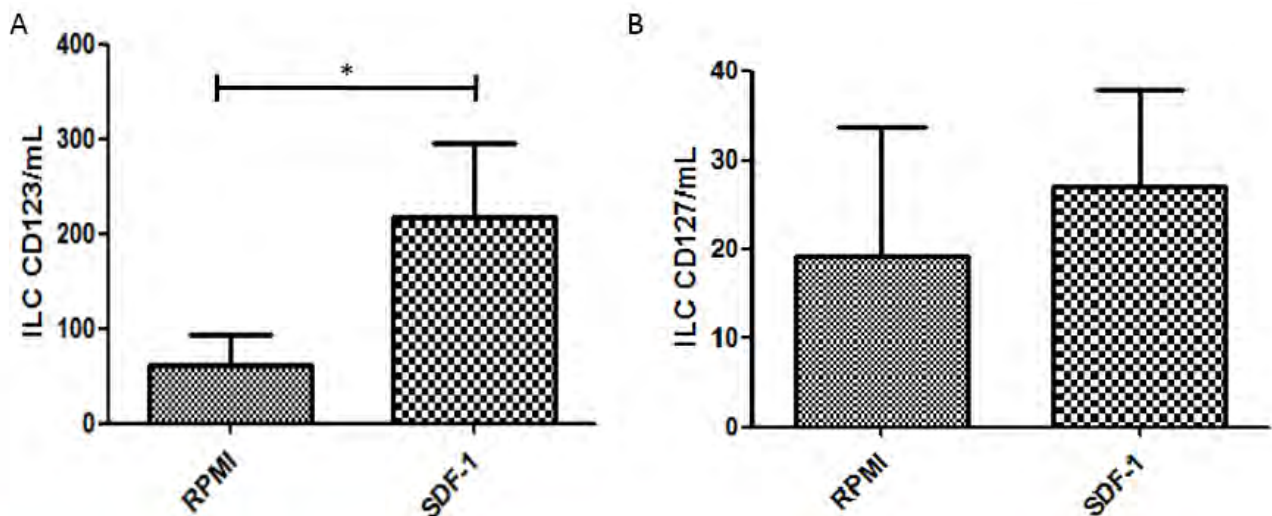


Figura 11. La población ILC CD123⁺ se moviliza en respuesta a SDF-1. Gráficas construidas a partir de los números absolutos de células migrantes **A** ILC CD123⁺ y **B** ILC CD127⁺, obtenidos de seis experimentos y diez repeticiones independientes y después de 3.5 horas de migración Transwell sin estímulo y con SDF-1 100ng/mL. Mann Whitney *p<0.05

Se observa que la movilización de la población ILC CD123⁺ está incrementada significativamente en presencia de SDF-1 (**Figura 11A**), mientras que al analizar la población ILC CD127⁺ no encontramos diferencias significativas en la migración con SDF-1 (**Figura 11B**).

Cambios fenotípicos en la población ILC CD123⁺ y CD127⁺ migrantes y no migrantes en respuesta a SDF-1

En la literatura se ha descrito que el paso de linfocitos T y neutrófilos a través del endotelio puede modificar su inmunofenotipo⁴³, por lo tanto se analizó si el paso o el contacto de las ILC CD123⁺ y CD127⁺ con la monocapa endotelial pudiera

modificar la expresión de marcadores de superficie descritos en ambas poblaciones.

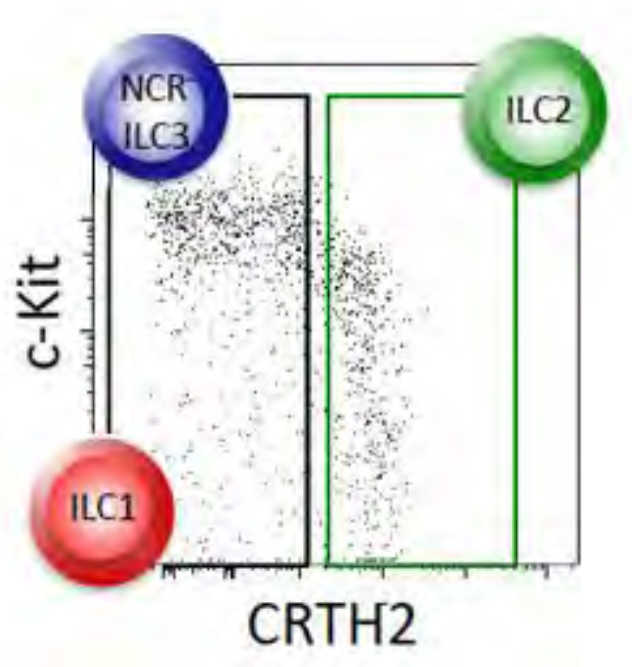


Figura 12. Estrategia de Identificación de los tres grupos de ILC mediante la expresión de c-Kit y CRTH2. Se muestra un plot representativo de la identificación de los subgrupos ILC. El grupo ILC1 se identifica por la ausencia de expresión de ambos marcadores (c-kit⁻CRTH2⁻), las ILC2 expresan CRTH2 (CRTH2⁺) y el grupo ILC3 expresa el marcador c-Kit (c-kit⁺). Modificado de Human innate lymphoid cells. Hazenberg M. & Spits H, 2014.

Se ha propuesto que las ILC pueden ser clasificadas en tres subgrupos de ILC: ILC1, ILC2 e ILC3¹, de acuerdo a la expresión de dos moléculas que son c-Kit y CRTH2. Para todos los subgrupos de ILC se evaluó la expresión de CD161, el cual es un receptor de unión a lectinas que se ha descrito en LT CD4, CD8, células MAIT, células NK así como linfocitos $\gamma\delta$ y que se reporta confiere funciones innatas⁴⁴. Se ha propuesto que la clasificación de una ILC depende de la expresión de c-Kit y CRTH2 (**Figura 12**): Las ILC pertenecientes al grupo 1 se identifican

por una nula expresión de c-Kit y CRTH2; las ILC del grupo 2 expresan el marcador CRTH2 mientras que la expresión de c-kit clasifica a una ILC como parte del grupo 3.

La gráfica de barras **(Figura 13)** nos permite comparar el inmunofenotipo de las células ILC CD123⁺ que estuvieron en contacto con la monocapa endotelial (no migrantes), las que lograron atravesarla (migrantes) y células en cultivo (control). Se puede observar en el porcentaje de población que expresa el marcador de superficie CD161, una tendencia de aumento en todos los grupos evaluados **(Figura 13B)** con diferencia significativa en los grupos de células migrantes sin estímulo y células no migrantes estimuladas.

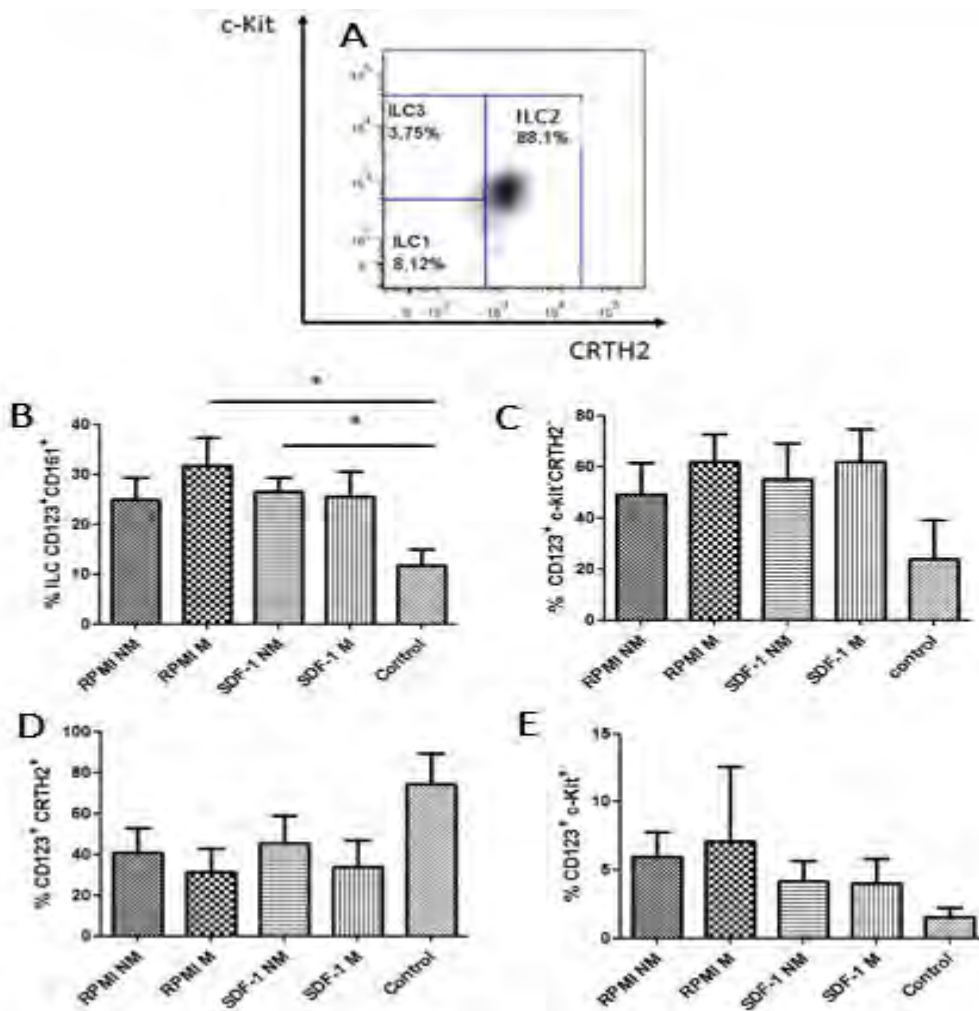


Figura 13. Porcentaje de la población ILC CD123⁺ con inmunofenotipo de ILC1, ILC2 o ILC3 Comparación del inmunofenotipo de células ILC CD123⁺ no migrantes (NM) y migrantes (M) después de 3.5 horas de migración Transwell sin estímulo (RPMI) y con SDF1 100ng/mL. **A.** Se muestran plots representativos de la identificación de los tres subgrupos de ILC CD123⁺ de acuerdo a la expresión basal de los marcadores c-Kit y CRTH2. **B.** Evaluación de poblaciones Lin⁻CD123⁺CD161⁺. **C.** Evaluación de poblaciones con inmunofenotipo ILC1 Lin⁻CD123⁺ CRTH2⁻ c-Kit⁺. **D.** Evaluación de poblaciones con inmunofenotipo ILC2 Lin⁻CD123⁺ CRTH2⁺. **E.** Evaluación de poblaciones con inmunofenotipo ILC3 Lin⁻CD123⁺ c-Kit⁺. Los resultados fueron obtenidos de 6 experimentos con 9 repeticiones independientes. * p<0.05

Al analizar el inmunofenotipo ILC1, ILC2 o ILC3 de la población ILC CD123⁺ en comparación con el control, se puede observar que el paso o contacto con el endotelio tiende a aumentar el porcentaje de poblaciones que expresan un inmunofenotipo ILC1 e ILC3 (**Figura 13C y 13E**) mientras que el porcentaje de

poblaciones que expresan el inmunofenotipo ILC2 (**Figura 13D**) presenta una tendencia de disminución. También se puede notar que la mayoría de las ILC CD123⁺ tienden a adquirir un inmunofenotipo de ILC1.

Otro de los cambios fenotípicos evaluados en la población ILC CD123⁺ fue la expresión de CD127 en células migrantes y no migrantes en presencia de SDF-1. La **Figura 14** muestra los histogramas representativos y su IMF en las ILC CD123⁺ migrantes con estímulo (**Figura 14A**). La comparación de las medias de IMF de CD127 obtenidas en seis experimentos con diez repeticiones independientes (**Figura 14B**), muestra una tendencia de aumento en la expresión de este marcador en todos los grupos evaluados cuando se les compara con el grupo control, siendo esta expresión mayor en algunos individuos de los grupos migrantes.

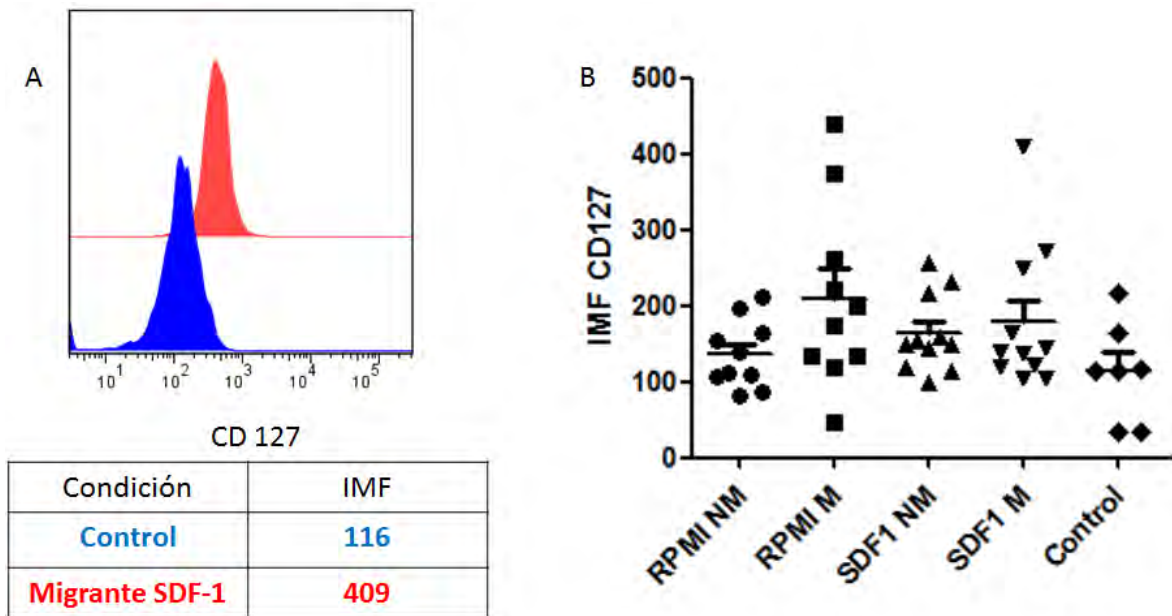


Figura 14. Expresión de CD127 en la población ILC CD123⁺ proveniente de Células Mononucleares de Sangre Periférica. A. Se muestran histogramas representativos de la IMF de CD127 en la población CD123⁺ migrante (M) estimulada con SDF-1 después de 3.5h de migración Transwell (SDF1 100ng/mL). El inciso **B.** muestra la IMF de CD127 en células ILC CD123⁺ M y NM resultante de 6 experimentos independientes.

Estos resultados indican que la interacción y cruce de las ILC CD123⁺ por el endotelio podría inducir cambios en el inmunofenotipo de esta población ya que hay una tendencia a incrementar la expresión de CD161, del fenotipo ILC1 e ILC3 así como de CD127.

Cambios fenotípicos en la población CD127⁺ migrantes y no migrantes en respuesta a SDF-1

Aunque el estímulo de SDF-1 no tuvo un efecto en la movilización de la población ILC CD127⁺ (**Figura 11**), se quiso evaluar si existía algún cambio fenotípico de las células que estuvieron en contacto con la monocapa endotelial y las que lograron atravesarla (**Figura 15**). El porcentaje de población ILC CD127⁺

que expresa CD161 disminuye de manera significativa para todos los grupos que estuvieron en contacto con el endotelio habiendo o no estímulo (**Figura 15B**).

También se observa que al estar en contacto con el endotelio esta población presenta una tendencia a aumentar el inmunofenotipo ILC1, siendo este aumento significativo en las células que migraron en respuesta a SDF-1 (**Figura 15C**).

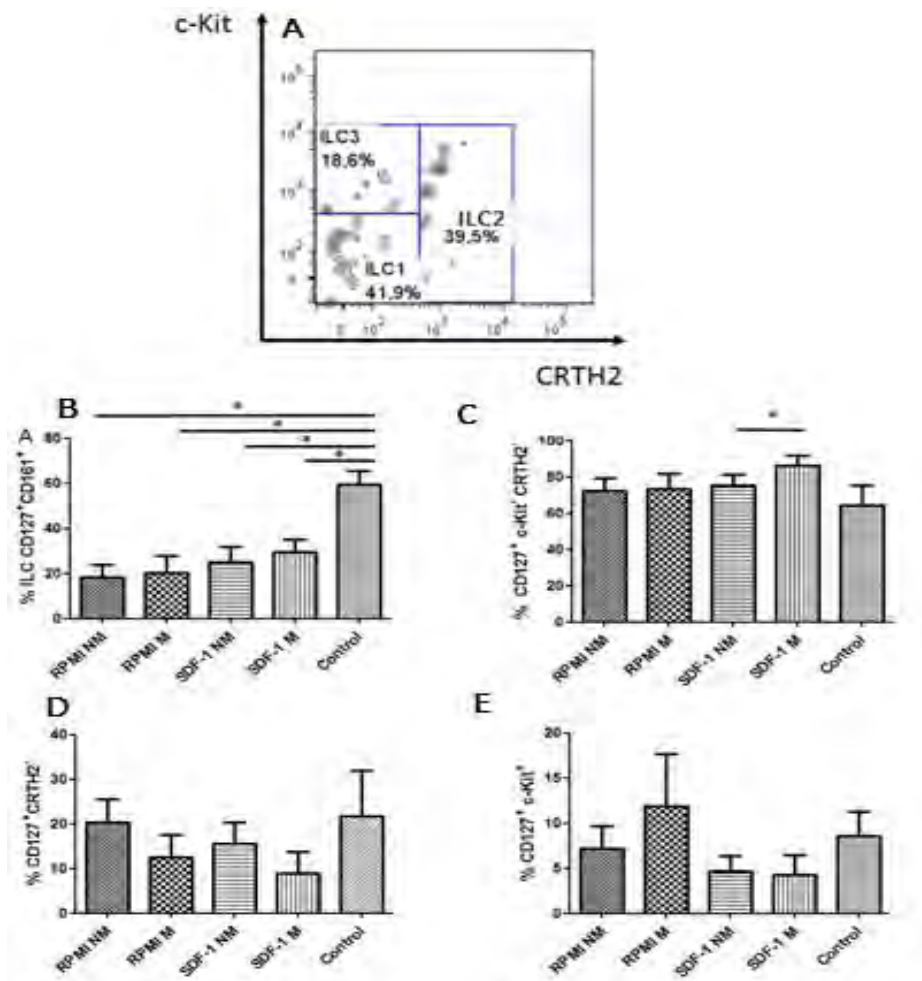


Figura 15. Porcentaje de la población ILC CD127⁺ con inmunofenotipo de ILC1, ILC2 o ILC3 Comparación del inmunofenotipo de células ILC CD123⁺ no migrantes (NM) y migrantes (M) después de 3.5 horas de migración Transwell sin estímulo (RPMI) y con SDF1 100ng/mL. **A.** Se muestran plots representativos de la identificación de los tres subgrupos de ILC CD127⁺ de acuerdo a la expresión basal de los marcadores c-Kit y CRTH2 **B.** Evaluación de poblaciones Lin⁻CD127⁺. **C.** Evaluación de poblaciones con inmunofenotipo ILC1 Lin⁻CD127⁺ CRTH2⁻ c-Kit⁺. **D.** con inmunofenotipo ILC2 Lin⁻CD127⁺ CRTH2⁺. y **E.** con inmunofenotipo ILC3 Lin⁻CD127⁺ c-Kit⁺. Los resultados fueron obtenidos de 6 experimentos y 9 repeticiones independientes. *p<0.05

En el caso de las células que expresan un inmunofenotipo ILC2 (**Figura 15D**) se observa una disminución en el porcentaje de células pertenecientes a este subgrupo, siendo las células migrantes las que presentan una disminución más notoria. Finalmente el porcentaje de población con inmunofenotipo ILC3 (**Figura 15E**) muestra una tendencia de disminución, con excepción de las células que migraron sin estímulo, en las cuales hay un aumento en el porcentaje de expresión del inmunofenotipo ILC3 en comparación con el control.

Estos resultados indican que la interacción y cruce de las ILC CD127⁺ por el endotelio induce cambios fenotípicos en esta población disminuyendo la expresión de CD161 y del fenotipo ILC2 e ILC3.

Movilización de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ de SP en respuesta a MIP3 α

Una vez evaluados los efectos en la movilización y en el fenotipo de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ en respuesta a SDF-1 se evaluó el potencial de movilización e inmunofenotipo de ambas poblaciones en respuesta a MIP-3 α en el sistema de migración Transwell con un recubrimiento de células endoteliales. Para ello CMSP fueron colocadas en el pozo superior y después de 3.5 horas de incubación las células migrantes (M) y no migrantes (NM) se recolectaron, contaron, fijaron y se tiñeron para su análisis mediante citometría de flujo.

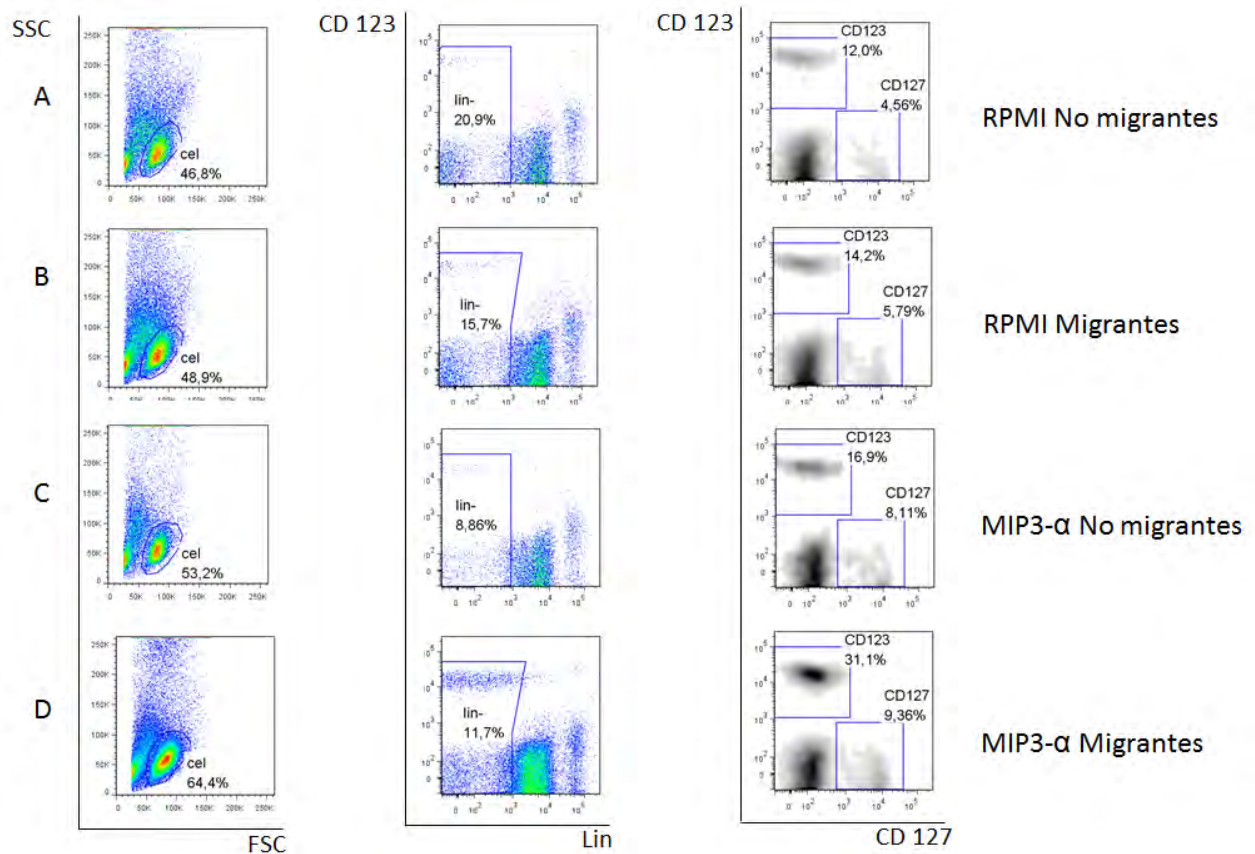


Figura 16. Movilización de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ en respuesta a MIP3 α en presencia de células HUVEC. Plots representativos del porcentaje de células migrantes CD123⁺ y CD127⁺ provenientes de Sangre Periférica en respuesta a MIP3 α (100ng/mL) después de 3.5 horas de migración en pozos Transwell recubiertos con células HUVEC. En los incisos **A.** y **B.** se observan los Plots representativos de las células sin estímulo CD123⁺ y CD127⁺ no migrantes y migrantes respectivamente. En los incisos **C** y **D** se muestran los plots representativos de las células CD123⁺ y CD127⁺ no migrantes y migrantes con MIP3 α .

En la **Figura 16** se muestran plots representativos obtenidos por citometría de flujo donde se observa que en respuesta a MIP3 α el porcentaje de poblaciones migrantes ILC CD123⁺ y CD127⁺ tiende a incrementar (**Figura 16D**) en comparación a los pozos que no tenían el estímulo (**Figura 16B**). Después de realizar tres experimentos independientes y de obtener los números absolutos de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ migrantes y no migrantes, se construyeron dos gráficas de barras (**Figura 17**) en las que se muestra una tendencia de

incremento en la movilización de las poblaciones ILC CD123⁺ (**Figura 17A**) y CD127⁺ (**Figura 17B**) cuando están en presencia de MIP-3 α .

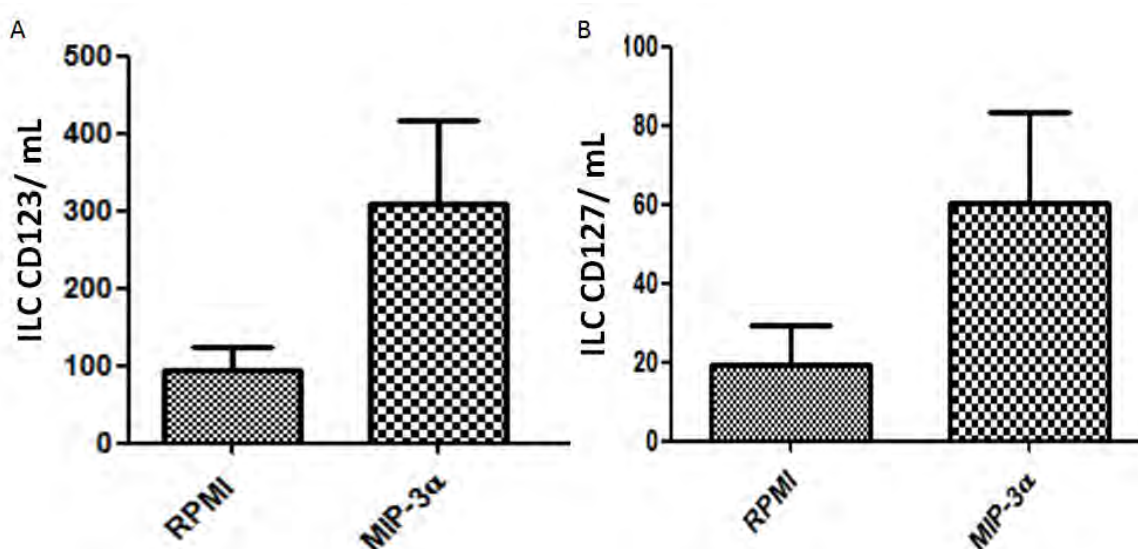


Figura 17. Las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ se movilizan en respuesta a MIP-3 α . Gráficas construidas a partir de los números absolutos de células migrantes **A** ILC CD123⁺ y **B** ILC CD127⁺, obtenidos de tres experimentos independientes y después de 3.5 horas de migración Transwell sin estímulo (RPMI) y con MIP-3 α 100ng/mL.

Cambios fenotípicos en la población ILC CD123⁺ y CD127⁺ migrantes y no migrantes en respuesta a MIP-3 α

Además de evaluar la movilización de las poblaciones ILC también se evaluó su inmunofenotipo en aquellas células migrantes y no migrantes. La **Figura 18** muestra que el porcentaje de población ILC CD123⁺ que expresa el inmunofenotipo ILC1 (**Figura 18A**) tiende a disminuir en las células que no cruzaron la monocapa endotelial. También se observa que el inmunofenotipo ILC2 se conserva en las células migrantes y no migrantes (**Figura 18B**), mientras que el inmunofenotipo de ILC3 tiende a disminuir en todos los grupos (**Figura 18C**).

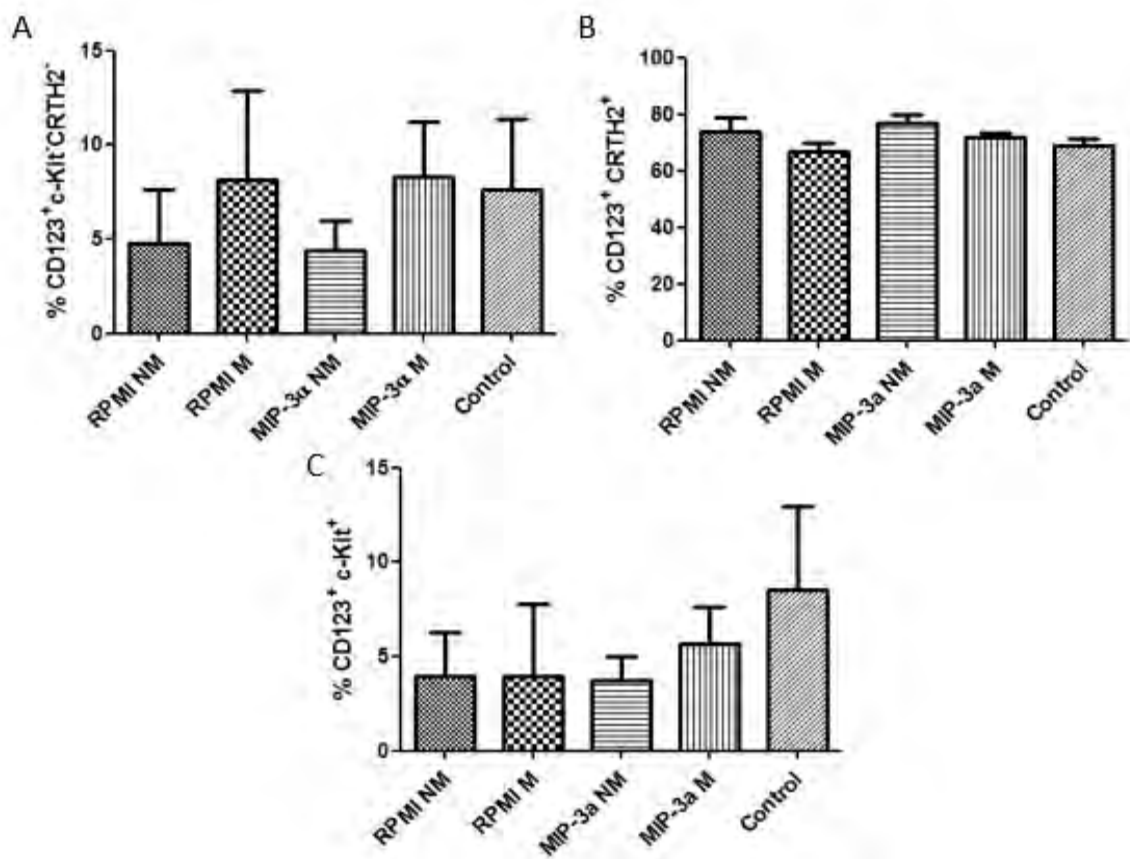


Figura 18. Porcentaje de la población ILC CD123⁺ con inmunofenotipo de ILC1, ILC2 o ILC3 Comparación del inmunofenotipo de células ILC CD123⁺ no migrantes (NM) y migrantes (M) después de 3.5 horas de migración Transwell sin estímulo (RPMI) y con MIP-3α 100ng/mL. **A.** poblaciones con inmunofenotipo ILC1 Lin⁻CD123⁺ CRTH2⁻ c-Kit⁺. **B.** poblaciones con inmunofenotipo ILC2 Lin⁻CD123⁺ CRTH2⁺. **C.** poblaciones con inmunofenotipo ILC3 Lin⁻CD123⁺ c-Kit⁺. Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes.

Además de los marcadores de subgrupos de ILC se evaluó si en la población ILC CD123⁺ también se modificaba la expresión de CD127 en respuesta a MIP3α. La **Figura 19** muestra el análisis de la expresión de CD127 por medio de la IMF en la población ILC CD123⁺ migrante con estímulo (**Figura 19A**). Al comparar las medias de IMF de CD127 obtenidas en tres experimentos y ocho repeticiones independientes (**Figura 19B**), se observa que ocurre una disminución en la

expresión de este marcador en todos los grupos evaluados bajo el estímulo de MIP-3 α cuando se les compara con el grupo control.

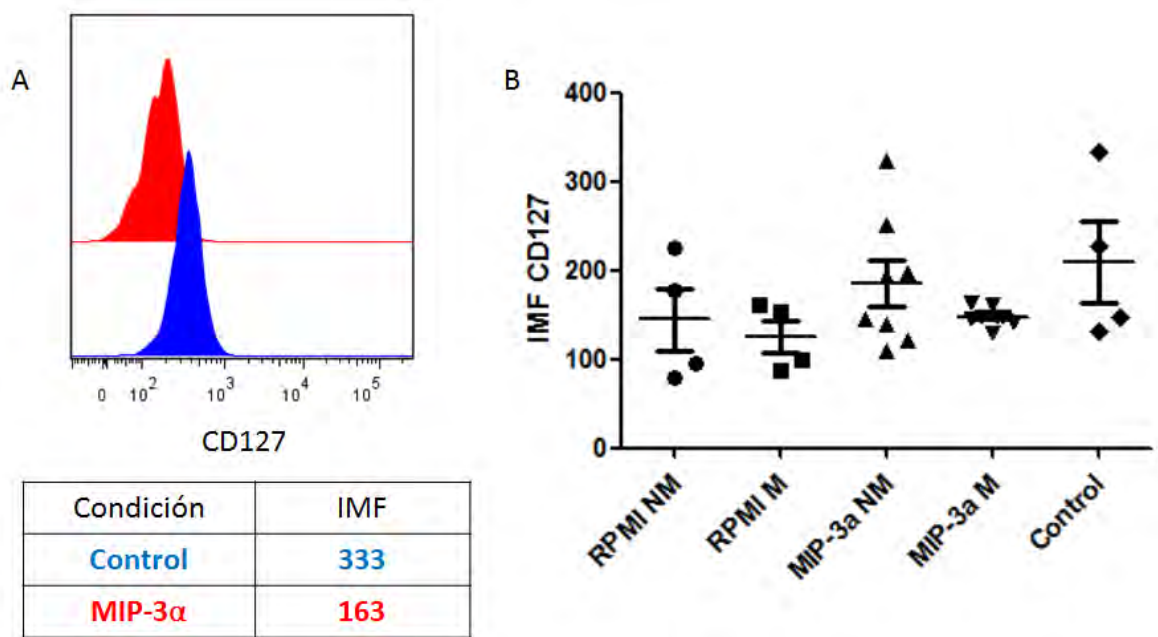


Figura 19. Expresión de CD127 en población ILC CD123⁺ proveniente de Células Mononucleares de Sangre Periférica. **A.** Se muestran histogramas representativos de la IMF de CD127 en la población ILC CD123⁺ migrante (M) estimulada con MIP-3 α después de 3.5h de migración Transwell (MIP-3 α 100ng/mL). El inciso **B.** muestra la IMF de CD127 en células ILC CD123⁺ M y NM resultante de 3 experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que la población ILC CD123⁺ es capaz de modificar su fenotipo al cruzar o estar en contacto con la monocapa endotelial, además las células migrantes disminuyen la expresión de CD127.

Cambios fenotípicos en la población ILC CD127⁺ migrantes y no migrantes en respuesta a MIP-3 α

Además de evaluar el efecto de MIP-3 α en la movilización de las células ILC CD127⁺, también se analizó el inmunofenotipo ILC1, ILC2 e ILC3 en las células M y NM. Se observa que en esta población no hay una modificación en el porcentaje de poblaciones que expresan el inmunofenotipo ILC1 al estar en contacto con el endotelio (**Figura 20A**). En la **Figura 20B** se observa que en las poblaciones migrantes hay una tendencia muy ligera de disminución del inmunofenotipo ILC2 mientras que la **Figura 20C** muestra que el porcentaje de poblaciones que expresa el inmunofenotipo ILC3 se mantiene en las células M y NM.

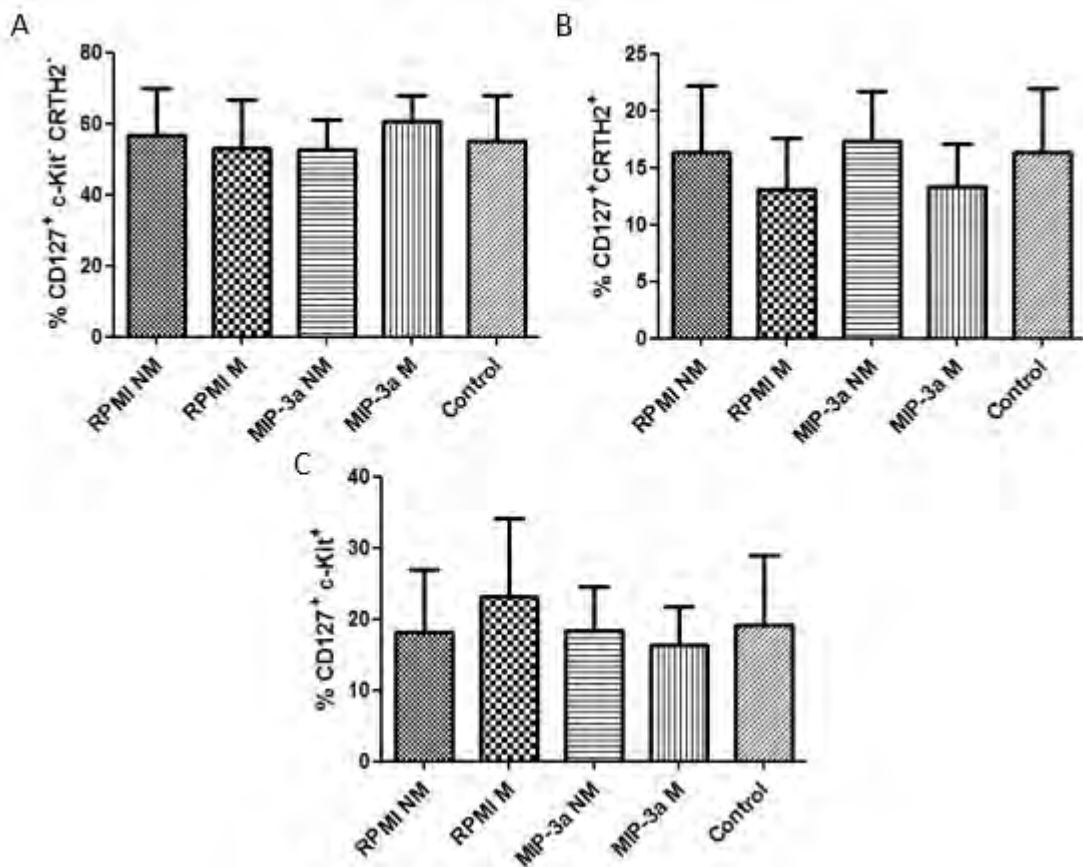


Figura 20. Porcentaje de la población ILC CD127⁺ con inmunofenotipo de ILC1, ILC2 o ILC3 Comparación del inmunofenotipo de células ILC CD127⁺ no migrantes (NM) y migrantes (M) después de 3.5 horas de migración Transwell sin estímulo (RPMI) y con MIP3α 100ng/mL. **A.** Evaluación de poblaciones con inmunofenotipo ILC1 Lin⁻CD127⁺ CRTH2⁻ c-Kit⁺. **B.** Evaluación de poblaciones con inmunofenotipo ILC2 Lin⁻CD127⁺ CRTH2⁺. **C.** Evaluación de poblaciones con inmunofenotipo ILC3 Lin⁻CD127⁺ c-Kit⁺. Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que la población ILC CD127⁺ no modifica su inmunofenotipo al cruzar o estar en contacto con la monocapa endotelial siendo estimuladas con MIP-3α.

Movilización de la población ILC CD123⁺ purificada en respuesta a SDF-1 en presencia de células HUVEC

Los experimentos de migración Transwell a través de un endotelio anteriormente descritos se realizaron en un contexto multicelular (CMSP), en el que células migrantes y no migrantes no solo corresponden a poblaciones linaje negativo, CD123⁺ o CD127⁺ **(Figura 10 y 16)**. En tal condición, se observa que sólo la población ILC CD123⁺ muestra una movilización aumentada de manera significativa en respuesta al estímulo de SDF-1. Sin embargo se desconoce si esta movilización puede ser facilitada por alguna célula o si la célula posee de manera intrínseca esta capacidad de movilización. Por lo tanto se evaluó el potencial de movilización de células purificadas ILC CD123⁺ en respuesta a SDF-1. Para ello se empleó el sistema de migración Transwell con un recubrimiento de células endoteliales y se colocaron 100,000 células ILC CD123⁺ purificadas y después de tres horas de migración se contaron las células que se movilaron. En esta condición se observa que no hay un aumento en el número de células migrantes de la población ILC CD123⁺ estimuladas con SDF-1 **(Figura 21)**.

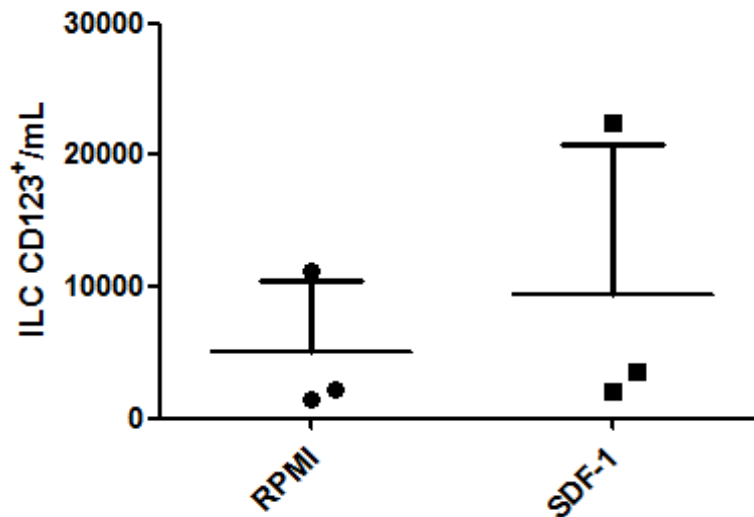


Figura 21. Movilización de Células ILC CD123⁺ purificadas en respuesta a SDF-1. 100, 000 células ILC CD123⁺ purificadas se colocaron en pozos Transwell recubiertos con células HUVEC, después de 3 horas de migración con y sin estímulo (SDF-1 100ng/mL) se contabilizaron las células migrantes por mL. La gráfica muestra los resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

Sin embargo, al analizar la expresión de CD127 en esta población purificada se observa que el porcentaje de células que expresan CD127 aumenta cuando estuvieron en contacto con las células endoteliales habiendo o no el estímulo de SDF-1 (**Figura 22B y C**) en comparación con la expresión de CD127 obtenida posterior al sort (**Figura 22A**).

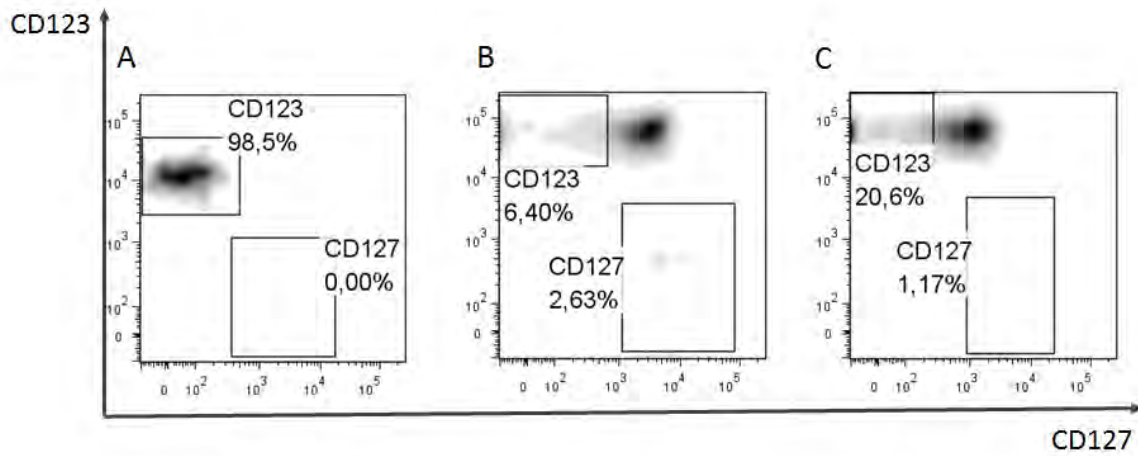


Figura 22. Expresión de CD127 en ILC CD123⁺ purificadas provenientes de sangre periférica. Plots representativos de la expresión de CD123 vs CD127 en células purificadas ILC CD123⁺ **A.** Después del sort. Células migrantes de pozos Transwell recubiertos con células HUVEC **B.** sin estímulo y **C.** estimuladas con SDF1 (100ng/mL) n=1.

Estos resultados sugieren que las ILC CD123⁺ purificadas no incrementan su movilización cuando están estimuladas con SDF-1 y que las células que consiguen atravesar la monocapa aumentan la expresión de CD127.

Análisis de Resultados

La descripción de las ILC CD127⁺ como una nueva célula integrante de la respuesta inmune innata que es capaz de participar en una respuesta inmune a través de la producción de citocinas clásicas de un LT cooperador, su participación en infecciones y su posible desregulación en enfermedades inflamatorias crónicas han generado gran interés por dilucidar los mecanismos que participan en su distribución hacia los órganos periféricos. La activación de receptores de quimiocinas que confieren tropismo parece ser uno de los mecanismos de redistribución involucrados. En nuestro equipo de trabajo se observó en SP y dermis de sujetos sanos la presencia de una población ILC clásica CD127⁺, así como una nueva población ILC que expresa CD123. Además se determinó que ambas poblaciones expresan los receptores de quimiocinas CCR6 y CXCR4, por lo que en este trabajo se evaluó el potencial de migración de estas células por medio de la activación de estos receptores con su respectivos ligantes MIP-3a y SDF-1.

Al evaluar el potencial de movimiento de ambas poblaciones en el modelo de esferoide productor de SDF-1, observamos que las dos poblaciones ILC son capaces de movilizarse al interior de la esfera posterior a las 24 horas de incubación; sin embargo los resultados sugieren que la población ILC CD123⁺ es capaz de hacerlo en mayor número. Lo anterior podría ser explicado a través de la diferente expresión del receptor CXCR4; como se muestra en la **figura 5** la IMF de CXCR4 en la población ILC CD123⁺ es mucho mayor que en la población CD127⁺,

lo que podría causar una mayor activación del receptor y movilización en respuesta a SDF-1.

Con base en el antecedente que sugiere que la población ILC CD123⁺ podría aumentar la expresión del marcador CD127 al estar presente en piel, se decidió evaluar si el contacto con otras poblaciones celulares (en este caso las células estromales del esferoide) pudiera inducir dicho cambio fenotípico. Los plots representativos mostrados en la **figura 9A, 9B y 9C** sugieren que existe un aumento en el porcentaje de poblaciones ILC CD123⁺ purificadas que incrementan la expresión de CD127, lo anterior se observa mediante el incremento de células dobles positivas. Además mediante la IMF se observa un incremento en la expresión de CD127 (**figura 9D**). Otro resultado interesante es el incremento en la expresión de CD127 observado en las células purificadas ILC CD123⁺ que estuvieron con y sin IL-3, por lo que descartamos que la presencia de dicha citocina favorezca este cambio fenotípico. Cabe mencionar que la adición de IL-3 al medio de cultivo se realizó con el fin de incrementar la sobrevivencia de las ILC CD123⁺ durante la incubación de 24 horas, conforme a lo observado en experimentos anteriores⁴².

Se ha descrito que la expresión de CD127 es inducible en Linfocitos T CD4 bajo un estímulo de IL-2⁴⁵, activación del TCR⁴⁶, TNF- α , **así como presencia** de glucocorticoides⁴⁷. Lo anterior podría sugerir que el incremento en la expresión de CD127 en las ILC CD123⁺ podría ser resultado del contacto de esta población con las células estromales del esferoide así como por estimulación del SDF-1 u otra

citocina que el esferoide produzca, probablemente IL-2 o TNF- α . Los resultados obtenidos del modelo de esferoide productor de SDF-1 demuestran que las células ILC CD123⁺ y CD127⁺ son capaces de movilizarse probablemente bajo un estímulo de SDF-1. También sugieren que la interacción de las células no migrantes con las células estromales o con alguna citocina producida por el esferoide, podría incrementar la expresión de CD127 en la población ILC CD123⁺.

La posible redistribución de ambas poblaciones ILC desde SP hacia otros órganos requeriría de su capacidad de atravesar el endotelio vascular en respuesta a estímulos quimiotácticos, es por ello que se decidió evaluar su movilización empleando un sistema de migración Transwell con un recubrimiento de células endoteliales que simularía la monocapa endotelial vascular de un sistema *in vivo* en respuesta a SDF-1 o a MIP-3 α .

En la población ILC CD123⁺ se demostró la capacidad de movilizarse de manera significativa en respuesta a SDF-1, mientras que la población ILC CD127⁺ no se moviliza ante esta quimiocina. Lo anterior resulta interesante porque ambas poblaciones ILC expresan el receptor de SDF-1, sugiriendo que en la población ILC CD127⁺ podrían existir mecanismos de regulación que modulan la actividad y funcionalidad del receptor, además de la menor expresión de este receptor. En la literatura se reportan algunos mecanismos de regulación negativa de CXCR4. La asociación física de CXCR4 con otros receptores, como el receptor de opioides δ (DOR), inhibe su actividad⁴⁸ disminuyendo la polimerización de actina y en la liberación de Ca²⁺ intracelular⁴⁹. Otro mecanismo podría ser la desensibilización

heteróloga de CXCR4 por CCR2, esto genera una transinhibición y modulación negativa de la actividad de CXCR4⁵⁰. Si uno de los mecanismos descritos o la existencia de otro tipo de regulación en la activación de CXCR4 expresado en la población ILC CD127⁺ podrían estar afectando su movilización ante el estímulo de SDF-1 requiere de futuras evaluaciones.

Otro de los resultados interesantes observados en la movilización de ambas poblaciones, es la existencia de una migración basal en las células que no fueron expuestas al estímulo de SDF-1. Trabajos realizados en nuestro laboratorio reportan la expresión del Antígeno Linfocitario Cutáneo (CLA) mayoritariamente en la población ILC CD123⁺ ⁴². CLA es una glicovariante de PSGL-1, que es reconocida por las E-selectinas expresadas en el endotelio. Se reporta en la literatura que la expresión de CLA, principalmente en LT CD3, CD4 y CD8 confiere tropismo a piel tanto en condiciones homeostáticas como inflamatorias⁵¹ por lo que el movimiento basal observado en ambas poblaciones ILC puede ser consecuencia de la unión de CLA a las E-selectinas expresadas en las células endoteliales activadas de la monocapa.

Tomando en consideración que el paso a través del endotelio vascular en experimentos *in vitro* es capaz de inducir diversos cambios en el inmunofenotipo de Linfocitos T, Linfocitos B, neutrófilos, monocitos y células dendríticas⁴³ se decidió determinar si existía cambio en el inmunofenotipo de las poblaciones ILC CD123⁺ y CD127⁺ en respuesta al estímulo quimiotáctico SDF-1.

Los resultados mostrados en la **figura 13B** muestran que en la población ILC CD123⁺ existe una tendencia a aumentar la expresión de CD161. El aumento en la expresión de este marcador ocurre en las células estimuladas y no estimuladas por lo que este cambio podría ser inducido por el contacto con el endotelio. Se ha descrito que en LT CD4, CD8, **así como en LT $\gamma\delta$, la expresión de este marcador correlaciona con la capacidad de producción de IFN- γ independiente de la activación de su TCR⁴⁴**. De manera interesante, el aumento en la expresión de CD161 en las ILC CD123⁺ coincide con una tendencia de aumento en el porcentaje de poblaciones que expresan el fenotipo ILC1. Siendo IFN- γ **la citocina** producida característicamente por este sub grupo de ILC, se podría sugerir una posible correlación entre la expresión de CD161 y la capacidad de producción de IFN- γ **así como la adquisición de un** inmunofenotipo de ILC1.

Los resultados de la **figura 13** sugieren que existe una tendencia de aumento en el porcentaje de células ILC CD123⁺ que expresan un fenotipo ILC1 e ILC3, siendo mayor este aumento en las células que lograron atravesar el endotelio. La interacción de las ILC CD123⁺ con moléculas expresadas en el endotelio vascular así como la presencia e interacción de estas células con la quimiocina SDF-1 son posibles factores que podrían explicar la variación de fenotipo y frecuencias observados en esta población en SP; lo anterior también podría explicar resultados previos del laboratorio en los que se observa que en dermis sana hay una mayor diversidad fenotípica que en SP, es decir que podemos observar la presencia de las tres poblaciones ILC. Los cambios en el

inmunofenotipo de las ILC CD123⁺ se observaron tanto en las células estimuladas como no estimuladas, lo que sugiere que es el contacto con la monocapa y no el estímulo de SDF-1 el que favorece esta mayor diversidad fenotípica. Si contacto con el endotelio es un factor clave para la generación de diversidad de ILC CD123⁺ en tejidos como la piel requiere de futuras investigaciones.

En cuanto a la evaluación de la expresión de CD127 en la población ILC CD123⁺, los resultados observados en la **figura 14C** sugieren que existe una tendencia a aumentar esta expresión tanto en las células migrantes y no migrantes, siendo este aumento más evidente en las células que cruzaron la monocapa endotelial incluso en ausencia de la quimiocina. Recordando que este incremento también se observó en las células ILC CD123⁺ purificadas no migrantes del esferoide, se sugiere que CD127 es inducible en esta población y que el contacto con otros tipos celulares, así como su interacción con citocinas del microambiente podrían ser factores importantes en este cambio fenotípico. Además de este cambio, sería importante evaluar si la mayor expresión de CD127 genera algún cambio funcional, ya sea en la sobrevivencia de estas células o en su capacidad de producir citocinas.

Aunque no se observó un efecto de SDF-1 en la migración de la población ILC CD127⁺, se decidió evaluar también si su paso por el endotelio o la presencia de la quimiocina tendrían algún efecto en el inmunofenotipo de esta población. Los resultados de la **figura 15** muestran que el inmunofenotipo de esta población parece mantenerse en las células migrantes y no migrantes, por lo que el contacto

o la presencia de SDF-1 no están teniendo un efecto en la modificación de su inmunofenotipo. De acuerdo a lo reportado en la literatura, en piel de sujetos sanos la población de mayor frecuencia es la ILC2²³, por lo que se sugiere que la población ILC CD127⁺ requiere de algún factor del microambiente en piel para inducir la adquisición de este fenotipo.

Además se observa que el porcentaje de células que expresan CD161 disminuyen de manera significativa en las células migrantes y no migrantes en comparación al control, esto ocurre incluso en ausencia del estímulo de SDF-1, por lo que probablemente sea la interacción con el endotelio un factor importante en la regulación de la expresión de este marcador en esta población. De acuerdo a lo descrito anteriormente, se ha asociado la expresión de CD161 con la capacidad proporcional de producir IFN- γ **en poblaciones linfoides, siguiendo esto se podría** pensar que la disminución del porcentaje de células ILC CD127⁺ que expresan CD161 conduciría a una menor capacidad de producción de IFN- γ .

Considerando que en los resultados mostrados en el modelo de esferoide sí se observó una movilización de las ILC CD127⁺ y que en el modelo de migración Transwell se probó que dicha movilización no se lleva a cabo por el eje SDF-1/CXCR4, cabe la posibilidad de que la movilización de esta población hacia el esferoide haya sido promovida por alguna otra quimiocina que el esferoide produzca. Una posible explicación a la movilización observada sería la activación de otro receptor expresado en ambas poblaciones ILC, como es el caso CCR6.

El uso de MIP-3a como estímulo quimiotáctico en el modelo de migración

Transwell con un recubrimiento de células endoteliales aumentó la migración de las poblaciones ILC CD123⁺ e ILC CD127⁺. Existe tendencia de aumento en la movilización estando presente el estímulo aunque no es significativa. Probablemente se requiere de un mayor número de repeticiones para tener resultados concluyentes. Sin embargo la movilización observada en ambas poblaciones parece indicar que el receptor CCR6 expresado es funcional y podría estar involucrado en la redistribución de ambas poblaciones celulares hacia tejidos periféricos donde se exprese esta quimiocina, por ejemplo la piel.

La evaluación del fenotipo de la población ILC CD123⁺ muestra que existe una tendencia de disminución en el porcentaje de células con fenotipo ILC1 y 3, mientras que el fenotipo ILC2 se mantiene en las células migrantes o no migrantes. Lo anterior sugiere que esta quimiocina no tiene influencia sobre el fenotipo de la población ILC CD123⁺ y que además sería necesario el microambiente generado en piel para generar la diversidad fenotípica observada en dermis.

En cuanto a la expresión de CD127 en esta población se observa una tendencia a disminuir este marcador en las células expuestas a MIP3a, contrario a lo observado en respuesta a SDF-1, lo que parecería indicar que diferentes estímulos quimiotácticos podrían estar influenciado la expresión de este marcador. Nuestros resultados sugieren que la población ILC CD123⁺ expresa CD127 y que también es capaz de modular su expresión. Sin embargo desconocemos los mecanismos que regulan este proceso. Definir si la expresión de CD127 pueda ser

modulada por citocinas o por la acción de diferentes quimiocinas sobre la población ILC o sobre el endotelio requerirá de una mayor evaluación.

Los resultados observados en la **figura 20** muestran que el fenotipo de las poblaciones migrantes y no migrantes ILC CD127⁺ bajo un estímulo de MIP-3 α se conserva, probablemente el microambiente formado en la piel fomente la diversidad fenotípica que se observa en piel. La interacción del endotelio con la población ILC CD123⁺ induce cambios fenotípicos los cuales podrían favorecer su diversidad, mientras que la población ILC CD127⁺ no se modifica fenotípicamente lo que podría indicar que esta población requiere de otros estímulos de citocinas que favorezcan su diversidad. Además estos resultados en cuanto a cambio fenotípico en presencia de SDF-1 o MIP-3 α sugieren que no todas las quimiocinas tienen el mismo efecto sobre estas poblaciones evaluadas.

Como se mencionó anteriormente, la población ILC CD123⁺ es capaz de movilizarse de manera significativa en respuesta a un estímulo de SDF-1 y en un ambiente multicelular. Sin embargo desconocemos si la movilización observada es resultado de la activación directa del receptor CXCR4 de la población ILC o si es consecuencia de la acción indirecta sobre otro tipo celular. Los resultados observados en la evaluación de la movilización de ILC CD123⁺ purificadas en el sistema de migración Transwell indican que estas células purificadas no son capaces de aumentar su movilización ante el estímulo de SDF-1. Esto podría sugerir que la migración observada en los experimentos realizados con CMSP sea promovida de manera indirecta mediante el uso de SDF-1 por otro tipo celular.

Los mecanismos indirectos que podrían intervenir en el aumento en la migración de las ILC en un contexto multicelular podría llevarse a cabo por la interacción de una célula mononuclear con la célula ILC, en un proceso similar al que ocurre en procesos inflamatorios en donde la movilización y activación de neutrófilos y monocitos promueve la producción de citocinas y quimiocinas como **TNF- α** y **CXCL8** en el endotelio vascular, las cuales incrementan la quimiotaxis y extravasación de más células inmunes hacia el sitio inmunológicamente comprometido¹⁷. Se puede observar en los plots b y d de la **Figura 10** que no sólo ocurre un aumento en la migración de las poblaciones ILC CD123⁺ bajo un estímulo de SDF-1, también se incrementa la movilización de poblaciones linaje positivo, por lo que en el contexto de movilización que nosotros evaluamos, el empleo de SDF-1 por alguna célula linaje positivo que exprese CXCR4, como por ejemplo las células dendríticas, podría promover su movilización y producción de alguna quimiocina que favorezca la posterior movilización de las ILC CD123⁺.

Otro mecanismo que podría estar mediando la movilización indirecta de las ILC CD123⁺ sería mediante la interacción de alguna célula mononuclear con el endotelio de la monocapa. Por ejemplo, se ha descrito que macrófagos activados son capaces de secretar citocinas como IL-1 o **TNF- α** , **estas citocinas son capaces** de activar el endotelio vascular incrementando la expresión de moléculas de adhesión necesarias para promover la diapedéisis celular, de esta manera la movilización de las ILC CD123⁺ podría verse favorecida.

La expresión de CD127 también fue evaluada en este modelo, los resultados de la **figura 22** muestran que las ILC CD123⁺ son capaces de aumentar la expresión de este marcador, incluso en ausencia del estímulo de SDF-1, por lo que se propone al contacto con la monocapa endotelial, o a la interacción de esta población con alguna citocina que las células que forman la monocapa produzcan, como los factores a ser evaluados para definir los mecanismos que promueven la regulación de la expresión de este marcador.

Conclusiones

En este trabajo se evaluó por primera vez a los receptores CXCR4 y CCR6 expresados en ambas poblaciones ILC provenientes de sujetos sanos como potenciales receptores de tropismo a piel. Se concluye que ambas poblaciones ILC son capaces de atravesar el endotelio vascular y se movilizan de manera diferencial: Las ILC CD123⁺ se movilizan en un contexto multicelular en respuesta a SDF-1 y MIP-3 α , además su interacción con el endotelio es capaz de modificar su inmunofenotipo, generar una mayor diversidad fenotípica y de regular la expresión de CD127. Por otro lado la población ILC CD127⁺ se moviliza en respuesta a MIP-3 α , sin embargo la interacción con el endotelio no genera cambios en su inmunofenotipo. Estos resultados sugieren que la activación de los ejes CXCR4/SDF-1 y CCR6/MIP-3 α median la movilización de ambas poblaciones ILC de manera homeostática, por lo tanto también se podría plantear la desregulación de estos ejes en enfermedades inflamatorias crónicas en las que se ha descrito la participación de ambas poblaciones ILC como psoriasis, enfermedad en la cual se encuentra reportado el aumento de la expresión de SDF-1 y MIP-3 α , **lo que podría** explicar el aumento de la frecuencia de ambas poblaciones ILC en este tipo de pacientes.

Referencias

1. Spits H. et al (2013). Innate lymphoid cells, a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol.* 13(2):145-9.
2. Chang H. K. (2015). Migration and Tissue Tropism of Innate Lymphoid Cells. *Trends Immunol.* 37(1):68-79.
3. Bernink J.H, Peters C. P, et al (2013) Human Type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nature immunology.* 14(3): 221-230.
4. Sonnenberg G. F. (2015). Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med.* 21(7):698-708.
5. Zlotoff D. A. et al (2010). CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood.* 11;115(10):1897-905.
6. Klose C. et al (2014) Differentiation of Type 1 ILCs from a Common Progenitor to All Helper-like Innate Lymphoid Cell Lineages. *Cell.* 157, Issue 2, p340–356.
7. Spits H. (2015) TOX sets the stage for innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 16(6):594-5
8. Constantinides M.G. (2014) A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature.*508(7496): 397-401
9. Hoyler T. (2012) The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity.*37(4):634-48
10. Montaldo E. (2016) Human innate lymphoid cells. *Immunology Letters* 11.01.2016.
11. Wilhelm C, Hirota K, Stieglitz B (2011). An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nat Immunol.* 9;12(11):1071-7.
12. Lauffenburger D. A, Horwitz A.F. (1996). Cell Migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84(3): 359–369 .

13. Vicente-Manzanares M. (2005). Cell migration at a glance. *J Cell Sci.* 118(Pt 21):4917-9.
14. Horwitz R, Webb Donna. (2003). Cell Migration. *Current Biology.* 13(19): 756-759.
15. Madri J.A, Graesser D. (2000). Cell Migration in the Immune System: the Evolving Inter-Related Roles of Adhesion Molecules and Proteinases. *Dev Immunol.* 7(2-4): 103–116.
16. Schimmel L, Heemskerk N, D. van Buul J. (2016). Leukocyte transendothelial migration: A local affair. *Journal Small GTPases.* 1-15.
17. Muller W. A. (2013). Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet Pathol.* 50(1): 7–22.
18. Muller W. A. (2003) Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in Immunology.* 24(6): 326–333.
19. Rüegg C, Postigo A, Sikorski E, Butcher E.C, Pytela R, Erle D.J. (1992) Role of integrin alpha 4 beta 7/alpha 4 beta P in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering. *J Cell Biol.* 117(1):179-89.
20. Kim M.H, Taparowsky E.J, Kim C.H. (2015) Retinoic Acid Differentially Regulates the Migration of Innate Lymphoid Cell Subsets to the Gut. *Immunity.* 21;43(1):107-19.
21. Tay S.S, Roediger B, Tong P, Tikoo S, Weninger W. (2014). The Skin-Resident Immune Network. *Curr Dermatol Rep.* 3(1): 13–22.
22. Nestle F. O, Di Meglio P, Jian-Zhong Qin, Nickoloff B.J. (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 9(10): 679–691.
23. Salimi M, Barlow J.L. (2013) A role for IL-25 and IL-33–driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.* 210(13): 2939-2950.

24. Kim B.S, Wojno E.D, Artis D.(2013). Innate lymphoid cells and allergic inflammation. *Curr Opin Immunol*. 25(6): 738-44.
25. Dyring-Andersen B, Geisler C, Agerbeck C, Lauritsen JP, Gúdjonsdóttir SD, Skov L, Bonefeld CM. (2014) Increased number and frequency of group 3 innate lymphoid cells in nonlesional psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 170(3): 609-16.
26. Kim B. S. (2015). Innate Lymphoid Cells in the Skin. *J Invest Dermatol*. 135(3): 673–678.
27. Abbas A. K. (2012). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier Saunders. 7a Ed. p.31.
28. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*. 25(2):75-84.
29. Horuk. R. (2001) Chemokine receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 12: 313-335.
30. Teicher B. A, Fricker S. P. (2010) CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 16(11): 2927–31.
31. Busillo J. M, Benovic J. L. (2007). Regulation of CXCR4 Signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1768(4): 952–963.
32. Pablos JL, Amara A, Bouloc A, et al. (1999) Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol*. 155(5): 1577-86.
33. Ratajczak M.Z, Zuba-Surma E, Kucia M, et al. (2006). The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*. 20(11):1915-24.
34. Rita Lucia Contento R. L, Molon B, Boullaran C. et al (2008). CXCR4–CCR5: A couple modulating T cell functions. *PNAS*. 105(29):10101–10106.
35. Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K. et al (2007). CXCL12-CXCR4 Engagement Is Required for Migration of Cutaneous Dendritic Cells. *Am J Pathol* 171(4): 1249–1257.

36. Jinquan T, Jacobi HH, Jing C. (2000). Chemokine stromal cell-derived factor 1alpha activates basophils by means of CXCR4. *J Allergy Clin Immunol.* 106(2):313-20.
37. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. (2003). The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor.* 14(5): 409-26.
38. Yamashiro S, Wang J.M, Yang D, Gong W.H, Kamohara H, Yoshimura T. (2000) Expression of CCR6 and CD83 by cytokine-activated human neutrophils *Blood.* 96(12): 3958-63.
39. Baba M, Imai T, Nishimura M, et al (1997). Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem.* 272(23):14893-8.
40. Liu Y, Lagowski J, Gao S. et al (2010) Regulation of psoriatic chemokine CCL20 by E3 ligases Trim32 and Piasy in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 130(5): 1384–1390.
41. Schmuth M, Neyer S, Rainer C, Grassegger A, Fritsch P, Romani N, Heufler C. (2002). Expression of the C-C chemokine MIP-3 alpha/CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function. *Exp Dermatol.* 11(2):135-42.
42. Mora Velandia L. M, Castro Escamilla O, et al (2016). A novel human CD123⁺ ILC-Like population endowed with migratory capabilities contributes to immunopathological features of psoriasis. *J. Frontiers in Immunology.* In press.
43. Noursharghe S, Marelli-Berg F. M. (2005) Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends in Immunology.* 26(3): 157–165.
44. Fergusson J. R, Smith K. E, Fleming V.M, (2014). CD161 defines a transcriptional and functional phenotype across distinct human T cell lineages. *Cell Rep.* 9(3):1075-88.

45. McKinstry K. K, Strutt T. M. et al (2014). Effector CD4 T-cell transition to memory requires late cognate interactions that induce autocrine IL-2. *Nature Communications* 5, Article number: 5377.
46. Simonetta F, Chiali A, Cordier C, Urrutia A, Girault I, Bloquet S, Tanchot C, Bourgeois C.(2010) Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 40(9):2528-38.
47. Mazzucchelli R, Durum S. K. (2007). Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature Reviews Immunology* 7, 144-154.
48. Salanga C.L, O'Hayre M, Handel T. (2009). Modulation of chemokine receptor activity through dimerization and crosstalk. *Cell Mol Life Sci.* 66(8):1370-86.
49. Wang J, He L, Combs C. A, Roderiquez G, Norcross M. A. (2006) Dimerization of CXCR4 in living malignant cells: control of cell migration by a synthetic peptide that reduces homologous CXCR4 interactions. *Mol Can* 5(10):2474-83.
50. Lee B, Doranz B. J, Rana S, et al. (1998) Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4. *J Virol.* 72(9):7450-8.
51. Bos J. D, De Boer O. J, Tibosch E, Das P. K, Pals S.T. *Cer Ther.* (1993) Skin-homing T lymphocytes: detection of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) by HECA-452 in normal human skin. *Arch Dermatol Res.* 285(4): 179-83.