



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INMUNOREGULACIÓN SOBRE  
LINFOCITOS T DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES PROVENIENTES  
DE LA PIEL DE PACIENTES CON PSORIASIS**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**CORTÉS MORALES VÍCTOR ADRIÁN**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS**  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-ZARAGOZA, UNAM  
**DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2018**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INMUNOREGULACIÓN SOBRE  
LINFOCITOS T DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES PROVENIENTES  
DE LA PIEL DE PACIENTES CON PSORIASIS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**CORTÉS MORALES VÍCTOR ADRIÁN**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS**  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-ZARAGOZA, UNAM  
**DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2018**



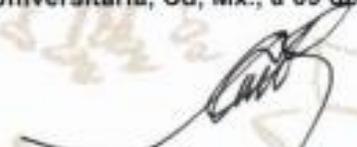
Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CORTÉS MORALES VÍCTOR ADRIÁN** con número de cuenta **516011608**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INMUNOREGULACIÓN SOBRE LINFOCITOS T DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE LA PIEL DE PACIENTES CON PSORIASIS"**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Vocal: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ  
Secretario: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA  
Suplente: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO  
Suplente: DRA. MARTA ELENA CASTRO MANRREZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 09 de enero de 2018

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por todo el apoyo recibido durante esta etapa de mi formación académica, profesional y personal.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría (clave: 708647) y el apoyo recibido para la realización de este trabajo (clave: 258205).
- Al programa de Formación de Investigadores y al Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (I.M.S.S.), por el apoyo recibido para la realización de este trabajo (clave: 1311).
- A mi tutor principal de tesis al Dr. Juan José Montesinos Montesinos, al igual que a los miembros del comité tutor, integrado por la Dra. María de Lourdes Mora García y la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, por el entusiasmo en el proyecto, así como sus observaciones que me apoyaron en el enriquecimiento del mismo.

- Al Dr. Juan José Montesinos Montesinos, le estoy muy agradecido por la oportunidad de adentrarme en su línea de investigación, así como como a sus aportaciones y su entusiasmo que me motivaron a encontrar una pasión por la ciencia.
- A mi comité tutor integrado por la Dra. Lulú Mora y la Dra. Lety Rocha, estoy muy agradecido por la paciencia y los aportes que me realizaron para poder enriquecer mi proyecto y mi persona, muchas gracias.
- A la Dra. Marta Castro, por sus enseñanzas y consejos en el proceso de forjarme en la investigación, valoro que siempre tuviste un espacio para mí en tu apretada agenda.
- A la Dra. Laura Bonifaz y al M. en C. Octavio Castro por el apoyo brindado en el conocimiento de la biología de la psoriasis, gracias por compartir sus conocimientos.
- A la Q.F.B. Marti Flores y a la M. en C. Pilar de la Rosa por estar conmigo desde el primer día que entre al laboratorio, aprecio mucho todos sus consejos en mi camino profesional, académico y personal.
- A la M. en C. Jessica Lakshmi Prieto Chávez por la enseñanza, consejos y correcciones en el aprendizaje de la técnica de citometría de flujo.
- A mi apreciado grupo de trabajo Gaby, Ixel, Erika, Lupe, Diana, Nacho, Carlos, Lucero, Keyra y Ayesha, por lo excelentes momentos que compartimos dentro y fuera del laboratorio, así como el aprendizaje de siempre tener algo nuevo que aprender.
- A mis compañeros del posgrado por ayudarme a comprender este largo camino de la maestría, así como que, si se puede desarrollar una amistad a pesar de una agenda llena de experimentos a Alicia, Bere, Monse, Dalia, Daniel, Mariana, Tomás, Joel y Libi.

*A mi familia por siempre estar conmigo apoyándome en todas las decisiones que he tomado, a mi papá, mamá, hermana, hermano, tío, primita hermosa, así como a mis sobrinitos esto va para ustedes, nunca dejaré de quererlos y siempre contarán conmigo.*

*Los amo.*

# INDICE

INDICE DE FIGURAS .....	i
INDICE DE TABLAS .....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
1. RESUMEN .....	1
2. ABSTRACT .....	3
3. INTRODUCCIÓN .....	5
3.1. Estructura y componentes de la piel.....	5
3.1.1. Epidermis.....	5
3.1.2. Dermis .....	6
3.2. La piel como órgano inmunológico .....	6
3.2.1. Microbiota comensal de la piel .....	6
3.2.2. Sistema Inmunológico Innato de la piel .....	8
3.2.3. Sistema Inmunológico Adaptativo de la piel.....	9
3.3. Psoriasis.....	10
3.3.1. Clasificación de la psoriasis .....	11
3.3.2. Comorbilidades de la psoriasis.....	12
3.3.3 Cambios en la piel debidos a la psoriasis .....	13
3.3.4. Inmunobiología de la enfermedad.....	14
3.4. Células Estromales Mesenquimales.....	17
3.4.1. Definición .....	17
3.4.2. Células Estromales Mesenquimales e Inmunoregulación.....	17
3.4.3. Regulación de las propiedades inmunoreguladoras de las MSCs .....	25
3.4.4. MSCs derivadas de piel .....	26
3.4.5. MSCs derivadas de piel en zonas afectadas por psoriasis .....	27
4. ANTECEDENTES .....	29
5. HIPÓTESIS .....	30
6. OBJETIVOS .....	30
6.1. Objetivo General .....	30
6.2. Objetivos Particulares .....	30
7. METODOLOGÍA.....	31

7.1. Separación de capas de la piel y cultivo de MSCs .....	31
7.2. Análisis Morfológico .....	31
7.3. Inmunofenotipo .....	32
7.4. Capacidad de diferenciación. ....	32
7.5. Evaluación de capacidad inmunoreguladora .....	33
7.6. Análisis Estadísticos.....	35
8. RESULTADOS .....	36
8.1. Las MSCs provenientes de piel de pacientes con psoriasis, presentaron morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación similares. ....	36
8.2. Las MSCs provenientes de la piel de pacientes con psoriasis no inhiben la proliferación de linfocitos T CD3, CD4 ni de CD8.....	39
8.3. Las MSCs derivadas de pacientes con psoriasis no afectan la expresión de moléculas de respuesta de activación temprana CD25, CD69 y CTLA-4.....	42
8.4. Efecto de MSCs derivadas de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis sobre la expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4.....	44
8.5. La expresión de PD-L1 es incrementada en MSCs provenientes de la piel de pacientes con psoriasis en presencia de linfocitos T activados .....	45
8.6. Evaluación de la producción de citocinas en presencia de MSCs derivadas de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis. ....	47
8.7. MSCs provenientes de piel de individuos sanos, así como de pacientes con psoriasis presentan disminuida su capacidad de generación de linfocitos Treg .....	49
9. DISCUSIÓN.....	52
10. CONCLUSIONES .....	64
11. PERSPECTIVAS .....	65
12. LITERATURA CITADA.....	66

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1: Estructura y componentes de la piel. ....	7
Figura 2: Imágenes de manifestaciones clínicas en psoriasis. ....	12
Figura 3: Componentes histológicos de una placa psoriática madura comparada con piel normal. ....	14
Figura 4: Dinámica bidireccional del flujo de información y células de una lesión con psoriasis. ....	16
Figura 5: Efectos inmunoregulatorios de MSCs sobre células inmunológicas. ....	18
Figura 6: Morfología y capacidad de diferenciación de MSCs de piel de individuos sanos y pacientes con psoriasis. ....	38
Figura 7: Las MSCs provenientes de la piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis, no inhiben la proliferación de linfocitos T. ....	41
Figura 8: Efecto de las MSCs sobre la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4 en linfocitos T. ....	43
Figura 9: Expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4 en cocultivo con MSCs. ....	45
Figura 10: La expresión de PD-L1 es incrementada en las MSCs derivadas de individuos sanos y de pacientes con psoriasis en presencia de linfocitos T activados. ....	46
Figura 11: Evaluación del perfil de concentración de citocinas en cocultivos de MSCs provenientes de piel de individuos sanos y pacientes con psoriasis con linfocitos T. ....	49
Figura 12: Las MSCs provenientes de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis poseen deficiente potencial para generar poblaciones reguladoras de linfocitos T. ....	51

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Análisis de Inmunofenotipo de MSCs provenientes de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis. ....	37
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## **ABREVIATURAS**

**AMCP:** Asociación Mexicana Contra la Psoriasis

**ATP:** Adenosina trifosfato.

**CBAs:** Perlas de captura por citometría de flujo

**CFSE:** Succinimidil éster de carboxifluoresceína

**CLA:** Antígeno asociado a linfocito cutáneo

**CMSP:** Células mononucleares de sangre periférica

**CTL:** Linfocito T citotóxico

**CTLA-4:** Antígeno 4 de linfocito T citotóxico

**DCs:** Células dendríticas

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**EGF:** Factor de crecimiento epidermal

**FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos

**GVHD:** Enfermedad injerto contra hospedero

**HGF:** Factor de crecimiento de hepatocitos

**HLA:** Antígeno leucocitario humano

**ICAM-1:** Molécula 1 de adhesión intracelular

**IDO:** Indoleamina 2,3-dioxigenasa

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**IL:** Interleucina

**IMSS:** Instituto Mexicano del Seguro Social

**iNOS:** Sintetasa de óxido nítrico inducible

**IS:** Individuo sano

**ISCT:** Sociedad Internacional para la Terapia Celular

**IS-D:** Dermis de individuo sano

**IS-E:** Epidermis de individuo sano

**IS-MO:** Médula ósea de individuo sano

**ISSSTE:** Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

**Linfocito Treg:** Linfocito T reguladores

**Linfocito Th:** Linfocito T cooperador

**mDCs:** Células dendríticas mieloides

**MFI:** Intensidad media de fluorescencia

**MHC:** Complejo principal de histocompatibilidad

**µg:** microgramo

**mg:** miligramo

**mL:** mililitro

**mm:** milimetro

**MSCs:** Células estromales mesenquimales

**MO:** médula ósea

**Célula NK:** Célula asesina natural

**PASI:** Índice de severidad y área de la psoriasis

**PD-L1:** Ligando 1 de muerte programada

**pDCs:** Células dendríticas plasmacitoides

**PHA:** Fitohemaglutinina

**pg:** Picogramos

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>

**PL:** Placenta

**PRRs:** Receptor de reconocimiento de patrón

**Pso:** Paciente con psoriasis

**Pso-DL:** Dermis de zona lesionada de pacientes con psoriasis

**Pso-DNL:** Dermis de zona no lesionada de pacientes con psoriasis

**Pso-EL:** Epidermis de zona lesionada de pacientes con psoriasis

**Pso-ENL:** Epidermis de zona no lesionada de pacientes con psoriasis

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**SALT:** Órgano linfoide asociado a piel

**SCU:** Sangre de cordón umbilical

**SFB:** Suero fetal bovino

**STAT:** Transductor de señal y activador de la transcripción

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta

**TCR:** Receptor de célula T

**TLR:** Receptor tipo Toll

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alpha

**VACAM-1:** Proteína 1 de adhesión celular-vascular

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

## **1. RESUMEN**

Las Células Estromales/Troncales Mesenquimales (MSCs) tienen propiedades inmunoregulatoras sobre componentes celulares del sistema inmunológico, ejerciendo un efecto sobre la proliferación y diferenciación de linfocitos T, principalmente por la participación de moléculas inmunosupresoras y generación de linfocitos T reguladores (Treg). Estudios previos han propuesto la presencia de MSCs en dermis de individuos sanos (IS), así como en pacientes con psoriasis (Pso). Sin embargo, pocos estudios han analizado el efecto que ejercen dichas células en un sistema de cocultivo *in vitro* con linfocitos T activados. Así, la determinación de sus propiedades inmunoregulatoras es importante para poder comprender su participación en la psoriasis.

**Objetivo:** Evaluar *in vitro* la capacidad inmunoregulatora de las MSCs provenientes de la piel de IS y Pso sobre linfocitos T CD3<sup>+</sup>.

**Metodología:** Mediante un sistema de migración celular de fragmentos de piel, se obtuvieron MSCs de pacientes con psoriasis: a) dermis lesión (Pso-DL) y sin lesión (Pso-DNL); b) epidermis lesión (Pso-EL) y sin lesión (Pso-ENL). Así como de dermis (IS-D), epidermis (IS-E) y de médula ósea (IS-MO) de individuos sanos como controles. Las MSCs fueron caracterizadas por citometría de flujo y se evaluó su capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos T CD3<sup>+</sup> de individuos sanos, fueron obtenidas a través de gradiente de densidad y se activaron con fitohemaglutinina (PHA) o perlas antiCD3/CD28 respectivamente. Los linfocitos T se cocultivaron en ausencia o presencia de MSCs. Por medio de citometría de flujo se evaluó su proliferación en las poblaciones CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, expresión de moléculas involucradas en su activación (CD25, CD69 y CTLA-4), generación de linfocitos Treg (CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>high</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), expresión del ligando 1 de muerte programada (PD-L1) en MSCs, así como la concentración de interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en medio condicionado.

**Resultados.** Las MSCs de Pso-DL, Pso-DNL, Pso-EL, Pso-ENL, IS-D e IS-E mostraron capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica, así como la expresión de marcadores de membrana característicos de esta población de células establecidos por la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT). Se observó que

las MSCs de piel de Pso e IS no tienen capacidad de disminuir la proliferación sobre linfocitos T ni de generar linfocitos Treg, en comparación con aquellas de IS-MO, dichas células no modificaron la expresión de CD25, CD69 ó CTLA-4 en linfocitos T. Se detectaron concentraciones disminuidas de IL-4, IL-10 y TNF- $\alpha$  en los cocultivos con MSCs de piel de Pso y de IS comparándolos con IS-MO. Por otro lado, todas las fuentes evaluadas mostraron incremento en la expresión de PD-L1 en presencia de linfocitos T activados.

**Conclusiones.** La capacidad inmunoreguladora disminuida de MSCs provenientes de la piel de Pso, posiblemente contribuya al microambiente inflamatorio de la patología.

## **2. ABSTRACT**

Mesenchymal Stromal/Stem Cells (MSCs) have immunoregulatory properties against immune cells. In particular, MSCs affect T cell proliferation and differentiation, primarily through immunosuppressive molecules and generation of regulatory T cells. Several studies have proposed the presence of MSCs in dermis of healthy donors and patients with psoriasis. However, few studies have analyzed their effect against CD3<sup>+</sup> T cells in a coculture system. Thus, determination of immunoregulatory properties is very important to understand the participation of skin derived MSCs in psoriasis.

**Aim:** To evaluate *in vitro* the immunoregulatory capacity of skin derived MSCs from healthy donors and patients with psoriasis against T cells.

**Methods:** Through cell migration system of skin fragments, MSCs were obtained from: a) dermis of psoriasis lesion skin (Pso-DL) and nonlesion skin (Pso-DNL); b) epidermis of psoriasis lesion skin (Pso-EL) and nonlesion skin (Pso-ENL). MSCs of dermis (IS-D), epidermis (IS-E) and bone marrow (IS-BM) from healthy donors were obtained as controls. MSCs were characterized by flow cytometry and their capacity for adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation was evaluated. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and CD3<sup>+</sup> T cells from healthy donors were obtained through density gradient, and were activated with phytohemagglutinin or anti-CD3/CD28 beads respectively. T cells were cocultivated in the absence or presence of MSCs. By flow cytometry were evaluated CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell proliferation, expression of CD25, CD69 and CTLA-4 in T cells, generation of regulatory T cells (CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>high</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), expression of programmed death-ligand 1 (PD-L1) in MSCs and finally we evaluated concentration of interleukin 4 (IL-4), interleukin 10 (IL-10), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) in conditioned medium.

**Results.** MSCs of Pso-DL, Pso-DNL, Pso-EL, Pso-ENL, IS-D, IS-E showed adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation capacity and expressed membrane markers for this cellular population established by International Society for Cellular Therapy (ISCT). It was observed that skin derived MSCs from patients with psoriasis and healthy donors did not have capacity to decrease T cell proliferation or generation of regulatory T cells, as compared with bone marrow. Skin derived MSCs from patients with psoriasis and healthy

donors did not modify the expression of CD25, CD69 or CTLA-4 in T cells and their coculture system showed a decreased level of IL-4, IL-10 and TNF- $\alpha$  as compared with bone marrow. MSCs from the skin of patients with psoriasis and healthy donors showed increased PD-L1 expression in a coculture system.

**Conclusions.** The decreased immunosuppressive capacity of skin derived MSCs may possibly contribute to the inflammatory microenvironment of the pathology.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1. Estructura y componentes de la piel**

La piel proporciona el primer encuentro con el ambiente, es el órgano más extenso del cuerpo humano y cubre en adultos un área de 1.8m<sup>2</sup>. Al igual que los pulmones y las mucosas del intestino contiene un versátil y bien coordinado sistema compuesto de células epiteliales e inmunológicas, capaz de ejercer una función de defensa contra agentes provenientes del exterior (Di Meglio *et al.*, 2011; Pasparakis *et al.*, 2014).

La piel ejerce funciones como: barrera física contra irritantes (epidermis), protección contra radiación ultravioleta (melanocitos en epidermis), regulador térmico (glándulas sudoríparas en dermis), resistencia contra trauma mecánico (dermis), sensor y discriminador táctil (receptores sensoriales en dermis y epidermis), regulador de pH , así como un sistema de inmunovigilancia contra antígenos exógenos y endógenos (dermis y epidermis) (Visscher y Narendran, 2014).

La habilidad de la piel de llevar a cabo sus funciones está relacionada con su estructura, la cual esta compuesta por una capa externa llamada epidermis y otra interna denominada dermis, separadas por una membrana basal (Di Meglio, *et al.*, 2011).

Debido al papel fisiológico de la piel, es necesario una continua auto-renovación en sus capas para reparar tejido dañado y reemplazar células viejas. Esta proceso es realizado por las células troncales en el estrato basal de la epidermis, folículo piloso, glándulas sebáceas (Forni *et al.*, 2012; Visscher y Narendran, 2014) y MSCs en dermis (Najar y Lagneaux, 2017).

##### ***3.1.1. Epidermis***

La epidermis es un epitelio plano estratificado con estrato córneo derivado del ectodermo durante la embriogénesis (Visscher y Narendran, 2014), está formada por los estratos basal, espinoso, granuloso y córneo, en los cuales cada uno de ellos presenta diferentes grados de diferenciación término-terminal de queratinocitos (Fuchs, 1990). El último estrato consiste en queratinocitos sin núcleo llamados corneocitos, mismos que se encuentran ligados entre si mediante desmosomas obteniendo integridad estructural (Di Meglio *et al.*, 2011).

Principalmente esta conformada por queratinocitos, aunque también alberga otros tipos celulares como: melanocitos (células encargadas de la pigmentación de la piel), células de Merkel (células mecanoreceptoras) y células del sistema inmunológico integradas por células de Langerhans y linfocitos T principalmente (Di Meglio *et al.*, 2011).

### **3.1.2. Dermis**

La dermis es un tejido conjuntivo derivado del mesodermo durante la embriogénesis, esta compuesta por una capa superior (capa papilar) y una inferior (capa reticular) (Visscher y Narendran, 2014). Contiene células estromales como fibroblastos y fibrocitos, al igual que células dendríticas dermales, linfocitos T, células NK, linfocitos B, células cebadas y macrófagos (Di Meglio *et al.*, 2011). Se encuentra formada por fibras de colágena y elastina, vasos linfáticos y sanguíneos, confiriendo a la dermis una estructura mecánica capaz de soportar movimientos, traumatismos y un infiltrado de células inmunológicas en caso de inflamación (Di Meglio *et al.*, 2011).

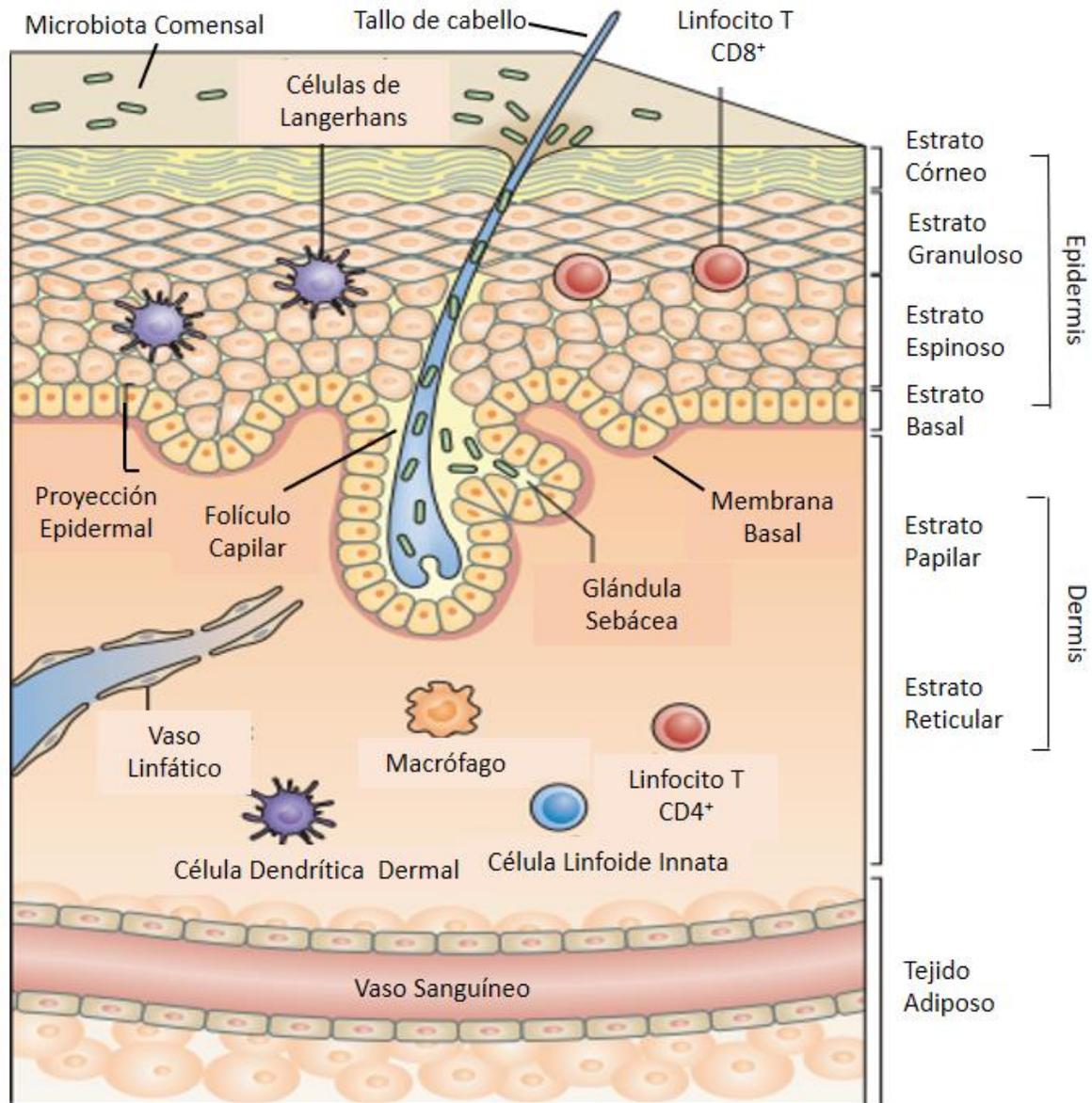
### **3.2. La piel como órgano inmunológico.**

La función inmunológica de la piel fue reconocida hasta el año de 1978, cuando J. Wayne Streilen adjudicó el término de órgano linfoide asociado a piel ("SALT" por sus siglas en inglés *Skin-Associated Lymphoid Tissue*), donde se indicó el tráfico continuo de células inmunológicas entre la piel y la circulación (Di Meglio *et al.*, 2011). A partir de 1987 se reconoce el sistema inmunológico cutáneo ("SIS" por sus siglas en inglés *Skin Immune System*) como un tejido con actividad celular no compartimentado, que actúa como protección de antígenos endógenos y exógenos (Bos *et al.*, 1987). La piel forma un microambiente con una comunicación dinámica y estructural entre células epiteliales y estromales, queratinocitos, microbiota comensal así como células del sistema inmunológico para mantener controlados procesos de inflamación, cicatrización de heridas y angiogénesis (Bangert *et al.*, 2011; Matejuk, 2017) (Figura 1).

#### **3.2.1. Microbiota comensal de la piel**

La piel alberga más de  $10^{12}$  bacterias/m<sup>2</sup> para mantener una homeostasis inflamatoria, debido a que inhiben la producción excesiva de citocinas liberadas después de daño epidermal, así como la colonización de bacterias patógenas (Di Meglio *et al.*, 2011). Tres

géneros de bacterias están bien adaptadas al ambiente acidificado y a los péptidos antimicrobianos de la piel: *Staphylococcus*, *Propionibacterium* y *Corynebacterium* (Di Meglio *et al.*, 2011; Pasparakis *et al.*, 2014).



**Figura 1: Estructura y componentes de la piel.** La piel está compuesta por estratos estratificados en la epidermis y por 2 capas en la dermis. En la epidermis residen células de Langerhans y linfocitos T CD8<sup>+</sup> principalmente. En la dermis existen poblaciones de macrófagos, células cebadas, linfocitos T y una reducida población de células linfocidas innatas (modificada de Pasparakis *et al.*, 2014).

### **3.2.2. Sistema Inmunológico Innato de la piel**

En la piel los queratinocitos, fibroblastos y células inmunológicas, secretan factores solubles que incluyen al escualeno, triglicéridos, monoésteres, péptidos antimicrobianos ( $\beta$ -defencinas humanas), catelicidinas (en contraste con otros mamíferos solo han sido encontradas en humanos), psoriasinas y RNAsa 7 (Bangert *et al.*, 2011; Visscher y Narendran, 2014). Los péptidos antimicrobianos, el sistema del complemento y las especies reactivas de oxígeno (“ROS” por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) son capaces de reconocer membranas hidrofóbicas de bacterias, donde forman poros y provocan una muerte microbiana, seguida de una respuesta inflamatoria (Bangert *et al.*, 2011).

Los queratinocitos constituyen el principal elemento estructural de la epidermis, (Matejuk, 2017), al igual que las células epiteliales y neutrófilos tienen la capacidad de reconocer proteínas microbianas mediante sus receptores de reconocimiento de patrones (“PRRs” por sus siglas en inglés *Pattern Recognition Receptors*) (Matejuk, 2017), este proceso produce citocinas como interleucina 1, (“IL-1” por sus siglas en inglés *Interleukin 1*), IL-6, TNF- $\alpha$ , y péptidos antimicrobianos, que provocan una respuesta inflamatoria (Bangert *et al.*, 2011; Di Meglio *et al.*, 2011; Pasparakis *et al.*, 2014).

Las células dendríticas (DCs) ejercen las siguientes funciones biológicas: a) la primera es la inducción de la presentación de antígeno a los linfocitos T naive y de memoria al ser estimuladas con señales de daño; b) la segunda es la inducción de tolerancia del sistema inmunológico (Bangert *et al.*, 2011). En condiciones normales se encuentran 2 tipos en la piel: 1) células de Langerhans en la epidermis, están relacionadas en la inducción de respuestas tolerógenicas y de activar a los linfocitos T en los ganglios linfáticos; y 2) células dendríticas dérmicas las cuales poseen características de macrófagos y de células presentadoras de antígenos (Bangert *et al.*, 2011; Yazdi *et al.*, 2016; Matejuk, 2017).

Las células cebadas se encuentran localizadas en la capa papilar de la dermis, secretan histamina, tradicionalmente están presentes en procesos de alergia, aunque poseen la propiedad de respuesta rápida contra infecciones, alérgenos, sustancias tóxicas y estrés

causado por cicatrización de heridas (Matejuk, 2017). Los macrófagos y células polimorfonucleares no se encuentran normalmente en la piel, pero en un proceso inflamatorio son atraídos y ejercen sus propiedades fagocíticas, este proceso puede ser acompañado con la liberación de péptidos antimicrobianos y de ROS (Bangert *et al.*, 2011). Las células asesinas naturales (“NK” por sus siglas en inglés *Natural Killer*) no se encuentran de manera constitutiva en la piel, pero son reclutadas en procesos inflamatorios donde intervienen moléculas como el IFN- $\gamma$ , tienen la capacidad de reconocer y eliminar células transformadas o infectadas mediante mecanismos de unión de los ligandos tipo complejo principal de histocompatibilidad (“MHC” por sus siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*) como NKG2D (Bangert *et al.*, 2011).

### ***3.2.3. Sistema Inmunológico Adaptativo de la piel***

La piel es el órgano que alberga la mayor cantidad de linfocitos T de memoria residente en el cuerpo. Dichas células expresan altos niveles de antígeno asociado a linfocito cutáneo (“CLA” por sus siglas en inglés *Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen*), CCR4 y CCR6, moléculas especializadas en el tráfico celular, también presentan una diversa variedad del receptor de célula T (“TCR” por sus siglas en inglés *T Cell Receptor*). Un adulto sano contiene en su piel alrededor de 2 billones de linfocitos T, lo cual equivale a el doble de los que se encuentran en circulación. Mayoritariamente se encuentran linfocitos Th1 de memoria efectora, aunque también se encuentran en menor cantidad poblaciones Th1 de memoria central, Th2 y Treg (Clark *et al.*, 2006; Di Meglio *et al.*, 2011).

En la epidermis se encuentran linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria efectora también llamados linfocitos T citotóxicos (“CTL” por sus siglas en inglés *Cytotoxic T Lymphocyte*), al igual que CD4<sup>+</sup>, que residen por largos periodos. Otras células inmunológicas pueden infiltrarla bajo circunstancias de inflamación. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reconocen un antígeno específico presentado por una célula que expresa MHC clase I, para posteriormente eliminarla. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria efectora residen en la dermis y epidermis, también se les conoce como linfocitos T cooperadoras (“linfocitos Th” por sus siglas en inglés *Helper T Cells*), estas células proveen un microambiente apropiado mediante la secreción de citocinas que conducen a una respuesta inmunológica (Richmond y Harris, 2014).

Para mantener la tolerancia inmunológica mediante la supresión de la actividad inflamatoria, este órgano alberga a linfocitos Treg, que son células especializadas en mantener mecanismos inmunoreguladores. En la piel existen poblaciones celulares con fenotipo CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>, que constituyen del 5% al 10% de los linfocitos T totales que residen en la piel (Clark, 2010).

La piel también alberga a linfocitos Th17, que producen las citocinas inflamatorias IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y TNF- $\alpha$ , dependen de IL-23 para su desarrollo, supervivencia y proliferación. Están implicados en el incremento de una respuesta inflamatoria y en desordenes autoinmunes. En condiciones sanas se encuentran en la piel en concentraciones mínimas, aumentando su número en procesos de inflamación (Lowe *et al.*, 2008; Clark, 2010).

Los linfocitos B usualmente no radican en órganos como la piel, aunque pueden participar en procesos inflamatorios de la misma. Su papel en la inmunidad cutánea aún no está bien definida (Nihal *et al.*, 2000; Richmond y Harris 2014).

### **3.3. Psoriasis**

Ferdinand Hebra en el siglo XIX, fue el primero en nombrar a la psoriasis, después de que Robert William en 1808, hiciera una descripción del color de las placas presentes en la enfermedad, separándola de otras dermatopatías (Menter y Stoff, 2011). Esta enfermedad no existe de manera espontánea en la piel de otros mamíferos, pero algunas características han sido inducidas en modelos murinos por técnicas genéticas o manipulaciones inmunológicas (Lowe *et al.*, 2007).

La psoriasis es una enfermedad crónica inflamatoria recurrente, es la enfermedad mediada inmunológicamente de la piel más común en adultos, es de etiología desconocida y puede ser susceptible a control mediante tratamiento médico prolongado y adecuado (Lowe *et al.*, 2007), con pocas recaídas espontáneas, (Liu *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2015). Su curso clínico puede variar con grados diferentes de afectación, morfología, y distribución. Se caracteriza en la mayoría de las veces por la presencia predominante de lesiones eritemoescamosas, afecta al 3% de la población en países industrializados (McDonald *et al.*, 2012; Villaseñor-Park *et al.*, 2012) y al 2% de la población mexicana, es

decir, poco más de 2 millones de habitantes. Se presenta con mayor frecuencia entre los 15 y 25 años de edad, aunque puede desarrollarse a cualquier edad (Asociación Mexicana contra la Psoriasis, 2014).

El inicio de la formación de la lesión aún es desconocido, pero se considera que se inicia cuando un agente infeccioso (*Streptococcus pyogenes*, virus de inmunodeficiencia humana), farmacológico (litio, corticoesteroides, agentes  $\beta$ -bloqueadores, anti-maláricos) u otros como el estrés físico, desencadenan la proliferación excesiva de queratinocitos (7-8 veces más rápida de lo normal) debido a la liberación de citocinas (Lowe *et al.*, 2007; Menter y Stoff, 2011).

En años recientes se ha relacionado la contribución genética al desarrollo de la psoriasis. Estudios en gemelos homocigóticos indican que los componentes genéticos juegan un papel para su predisposición. Se han identificado 19 distintos locus que le confieren susceptibilidad agrupándolos en 10 genotipos (PSORS I-IX). El PSOR I ubicado en el locus 6p21, es el más estudiado, y nos permite establecer una relación de polimorfismos en el sistema MHC con su manifestación. Estos datos han conducido a que sea denominada como una enfermedad compleja, es decir, que intervienen tanto factores genéticos como no genéticos para su desarrollo (Pasić *et al.*, 2009; Menter y Stoff, 2011).

### ***3.3.1. Clasificación de la psoriasis***

Datos de la Asociación Mexicana contra la Psoriasis del 2014 clasifica a la psoriasis de acuerdo al grado de afección:

- ❖ La psoriasis de placa, el tipo más común, afecta al 80% de los casos de psoriasis (Villaseñor-Park *et al.*, 2012), se caracteriza por lesiones cutáneas con borde rojizo cubierta de escamas blanquecinas (Figura 2a).
- ❖ La psoriasis goteada o guttata se caracteriza por pequeñas lesiones en forma de gota que aparecen en el tronco y en las extremidades, esta variante ocurre en menos del 2% de la población afectada, presentándose principalmente en menores de 30 años. Esta variante de la enfermedad se ha asociado a la infección del *Streptococcus pyogenes* (Villaseñor-Park *et al.*, 2012) (Figura 2b).

- ❖ La psoriasis invertida se manifiesta en forma de manchas lisas y rojas que pueden aparecer en los pliegues de la piel próximos a los genitales, bajo los senos o en las axilas (Figura 2c).
- ❖ La psoriasis eritrodérmica, es el tipo menos común de esta enfermedad. Afecta entre el 1 al 2.25% de los pacientes. Es una forma severa de carácter inflamatoria. Afecta a la mayor parte de la superficie corporal (75%) y se manifiesta en forma de manchas grandes, enrojecidas y muy irritadas. Se asocia con descamación de la epidermis, pérdida de cabello, malformación en las uñas, y síntomas sistémicos como: comorbilidades cardiacas (Villaseñor-Park *et al.*, 2012).
- ❖ La psoriasis pustulosa se caracteriza por elevaciones de la piel en cuyo interior existe un contenido de neutrófilos en el estrato corneo, clínicamente se presenta como postulas estériles. Son lesiones blancas rodeadas de piel enrojecida (Figura 2d).



**Figura 2: Imágenes de manifestaciones clínicas en psoriasis.** Psoriasis en placa (a); psoriasis tipo gota (b); psoriasis inversa (c); psoriasis pustulosa (d) (Villaseñor-Park *et al.*, 2012).

### 3.3.2. Comorbilidades de la psoriasis

Se ha reportado que estados severos de la psoriasis puede llevar a comorbilidades, es decir, que pueden participar junto con otros factores (como la obesidad) en el desarrollo de otras enfermedades como el síndrome metabólico, incremento en el riesgo en enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, enfermedades autoinmunes, así como artritis psoriática.

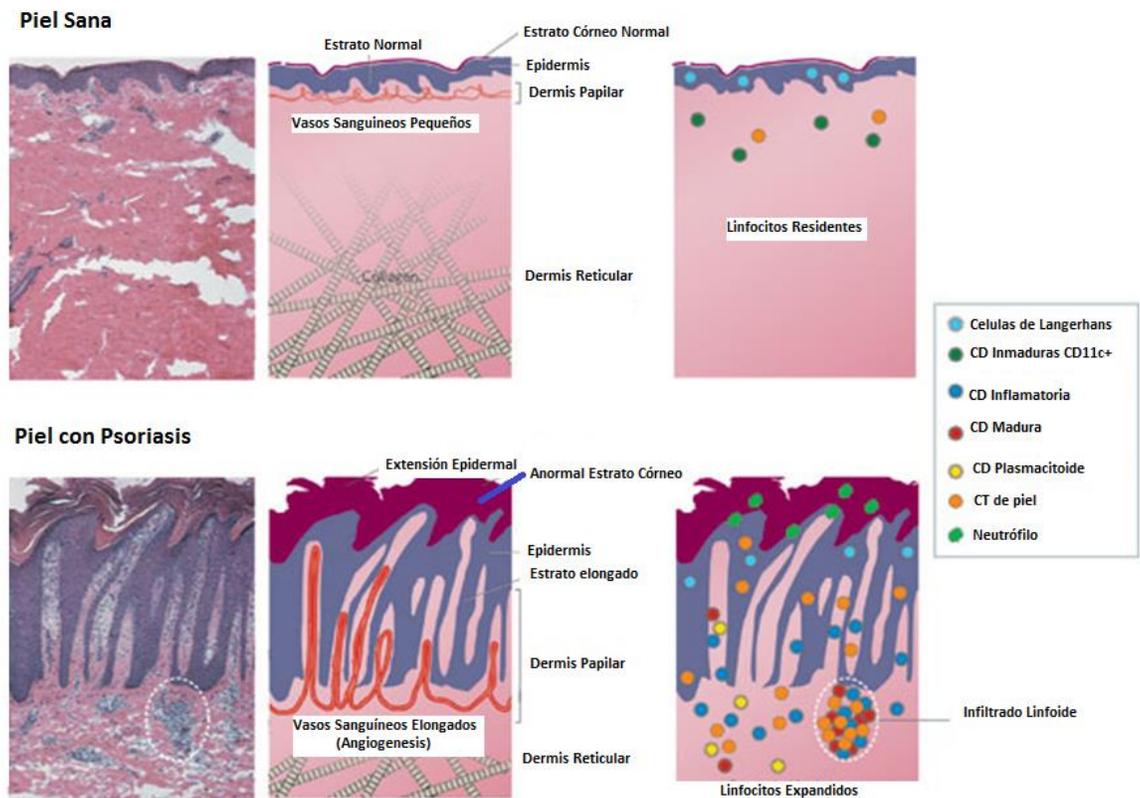
Estas enfermedades comparten características etiológicas y consecuencias en salud relacionados con la inflamación crónica (Kourosch *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2015). La artritis psoriática se presenta entre el 10 al 30% de pacientes que presentan psoriasis (Asociación Mexicana contra la Psoriasis, 2014). Debido a la participación desregulada de linfocitos Th1, esta enfermedad puede servir como un indicador de desregulación metabólico e inmunológico hacia un trastorno subyacente más amplio de inflamación sistémica (Kourosch *et al.*, 2008).

### ***3.3.3 Cambios en la piel debidos a la psoriasis***

La psoriasis se caracteriza por una proliferación desregulada de queratinocitos, reduciendo el ciclo celular de 13 días a 36 horas en zonas lesionadas (7-8 veces más de lo normal) (Bai *et al.*, 2015), se genera una expresión de productos genéticos diferentes a su contraparte normal. Se ha reportado que la vía de señalización del factor nuclear – kappa B (“NF- $\kappa$ B” por sus siglas en inglés *Nuclear Factor – kappa B*) se encuentra aumentada en queratinocitos afectados, al igual la transcripción de micro moléculas de ácido ribonucleico (“RNA” por sus siglas en inglés *RiboNucleic Acid*) como miR31 que reprime a reguladores negativos del ciclo celular como ppp6c (Yan *et al.*, 2015). Otra vía alterada es la de Wnt donde la disminución de la SFRP4 interfiere en el ciclo celular, provocando una proliferación descontrolada (Bai *et al.*, 2015).

En la epidermis es donde ocurren las manifestaciones más notorias de la enfermedad, ya que la rápida proliferación de queratinocitos inmaduros forma una hiperplasia evidente (acantosis) (Liu *et al.*, 2013), con una inadecuada diferenciación de corneocitos, con retención del núcleo en los mismos (paraqueratocis) (Lowe *et al.*, 2007). Las células epiteliales presentan edemas intracelulares (espongiosis). Existe una migración de neutrófilos y linfocitos T CD8<sup>+</sup> hacia el estrato córneo formando microabcesos de Munro (Lowe *et al.*, 2007). En la dermis se produce angiogénesis en la capa papilar, lo que causa el color rojizo característico en las lesiones de esta enfermedad (Lowe *et al.*, 2007), y una inflamación perivascular en el estrato papilar (Liu *et al.*, 2013). Los linfocitos T son los mediadores críticos de la inmunoreactividad asociada a psoriasis, debido a su participación de secreción de citocinas como IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-17A, IL-22, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y

a la activación de los mismos (Lowe *et al.*, 2007; Ayata *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015) (Figura 3).



**Figura 3: Componentes histológicos de una placa psoriática madura comparada con piel normal.** Histología de la piel de individuo sano y de zona lesionada de paciente con psoriasis. La piel esta formada por 2 capas: la primera es la epidermis compuesta principalmente por queratinocitos, y la segunda es la dermis compuesta por matriz extracelular, donde la colágena es el principal componente, aunque también contiene fibroblastos, una red neurovascular y apéndices epidermales extendidos en la dermis (folículos capilares, glandulas sebáceas y glandulas sudoríparas). En psoriasis el estrato córneo se elonga y el resto de los estratos se reduce en tamaño. En dermis se produce angiogénesis. En individuos sanos la piel contiene un notable número de células inmunológicas residentes y migratorias, en psoriasis este número es significativamente incrementado y muchas de las células son activadas (Modificada de Lowe *et al.*, 2007).

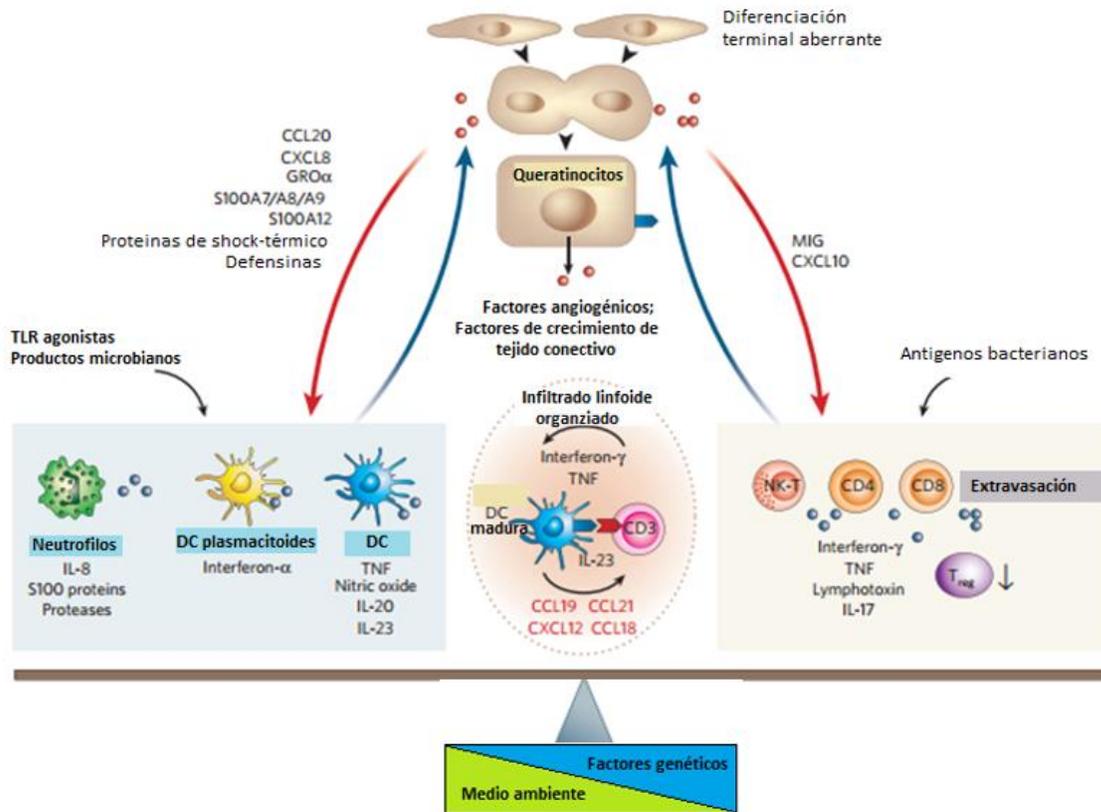
### 3.3.4. Inmunobiología de la enfermedad

Lande y colaboradores en el 2007, postularon la participación de fragmentos del ácido desoxirribonucleico (“DNA” por sus siglas en inglés *DesoxyriboNucleic Acid*) secretados por una sobreproducción de queratinocitos inmaduros, el cual al unirse con el péptido antimicrobiano “LL-37”, desencadena la respuesta inflamatoria en psoriasis. Se propone como primeros pasos la participación de las células dendríticas plasmacitoides (“pDCs” por sus siglas en inglés *Plasmacytoid Dendritic Cells*) que están altamente capacitadas en

reconocer partículas virales y microbianas, debido a que expresan el receptor tipo Toll 7 y 9 (“TLR-7” ó “TLR-9” por sus siglas en inglés *Toll - like receptor 7 or 9*), estos receptores normalmente no responden a DNA propio, sino más bien a uno viral o bacteriano que contienen secuencias de CpG múltiples (Lande *et al.*, 2007).

La proliferación descontrolada de queratinocitos promueve un ambiente rico en IFN y TNF- $\alpha$ , que induce la maduración de células dendríticas mieloides (“mDC”, por sus siglas en inglés *Myeloid Dendritic Cells*), la activación y la infiltración de pDCs y linfocitos T autoinmunes hacia la dermis y epidermis. Se facilita la unión de e-selectina y la molécula 1 de adhesión intercelular (“ICAM-1” por sus siglas en inglés *Intercellular Adhesion Molecule - 1*) por parte de las células endoteliales con las moléculas CLA-1 y el antígeno 1 asociado a función leucocítica (“LFA-1” por sus siglas en inglés *Leucocyte Funtion-associated Antigen 1*) de los linfocitos T. Una vez que se encuentran en la dermis estos últimos se activan gracias a las DCs maduras presentes (Menter y Stoff, 2011; Jiang *et al.*, 2015). La activación de mDC propicia a que un subconjunto de estas células deja la dermis y migra hacia los ganglios linfáticos, donde libera IL-23 y activan a los linfocitos T naive proinflamatorios, se liberen IL-20 al microambiente y se acelera la proliferación de queratinocitos (Menter y Stoff, 2011). Los linfocitos Th1 y Th17 son reclutados en la zona de lesión y comienzan a producir numerosas citocinas proinflamatorias que incluyen IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22. Se aumentan la proliferación de queratinocitos debido a la activación de genes que responden a INF a través de la señal de transducción y activación de la transcripción 1 y 3 (“STAT-1” y “STAT-3” por sus siglas en inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 1 and 3*) (Sano *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2013), se propone la participación de 1,300 genes (Lowe *et al.*, 2007). Adicionalmente esta proliferación epidermal excesiva, provoca la secreción de péptidos antimicrobianos y quimiocinas por parte de los queratinocitos, que estimulan a las DCs y liberación de más IL-23, se recluta a los neutrófilos en la epidermis y se activan fibroblastos dérmicos. Este ciclo de activación queratinocitos/DCs, DCs/linfocitos T y nuevamente linfocitos T/queratinocitos parece ser la razón del mantenimiento de la lesión, así como el balance entre la activación de células inmunológicas innatas, adquiridas y factores producidos por los mismos queratinocitos inmaduros que afecta de manera retroalimentativa el ambiente proinflamatorio, así como

una deficiente función de linfocitos Treg (Lowes *et al.*, 2007; Villaseñor-Park *et al.*, 2012) (Figura 4).



**Figura 4: Dinámica bidireccional del flujo de información y células de una lesión con psoriasis.** Existe un balance entre el sistema inmunológico innato y adquirido, donde las moléculas producidas por los queratinocitos en la epidermis actúan sobre el sistema inmunológico, estimulando DCs, neutrófilos, células NK y linfocitos T. Dentro del microambiente generado se liberan citocinas y factores de crecimiento debido a una expresión genética alterada por una hiperplasia desregulada, así como el aumento de la expresión de moléculas de adhesión para favorecer el tráfico celular. La psoriasis es denominada como una enfermedad compleja debido a la participación del medio ambiente y a la predisposición genética como factores desencadenantes de la enfermedad (Modificada de Lowes et al, 2007).

### **3.4. Células Estromales Mesenquimales**

#### **3.4.1. Definición**

Las MSCs son células que se identificaron y aislaron por primera vez de médula ósea (MO) (Friedenstein *et al.*, 1974), actualmente su presencia se ha demostrado en una gran cantidad de tejidos. Son células indiferenciadas que se han identificado como células con características adherentes, clonogénicas, no fagocíticas y de tipo fibroblastoide *in vitro*, tienen la capacidad de autorenovarse y son capaces de diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos y condroblastos, con una alta capacidad de expansión (Short *et al.*, 2003; Montesinos *et al.*, 2009).

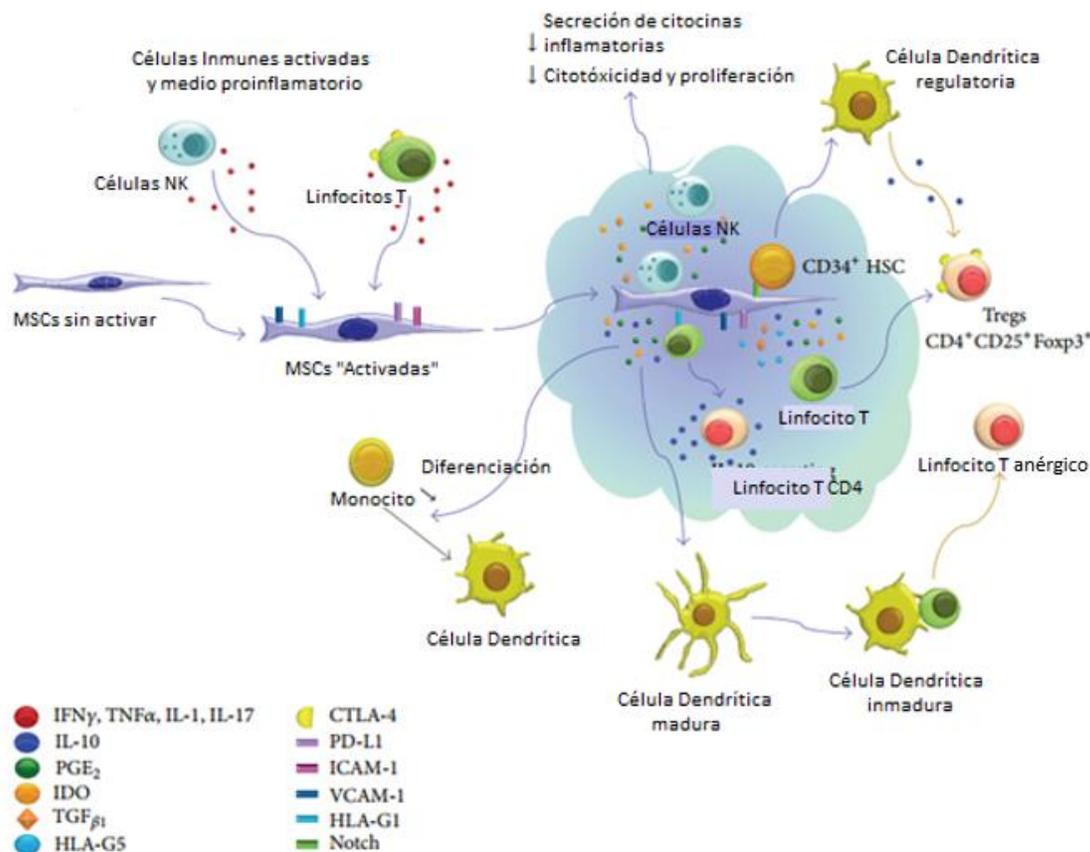
La caracterización de las MSCs se ha establecido por la presencia de marcadores de superficie, así como sus propiedades funcionales (Montesinos *et al.*, 2009). En el año 2006 la ISCT estableció 3 criterios para definir la caracterización de estas células: la primera es que deben de ser adherentes en cultivo *in vitro* con una alta capacidad de proliferación, la segunda es que la células deben expresar las moléculas de superficie CD73, CD90 y CD105 ( $\geq 95\%$ ), así como, una baja expresión ( $\leq 2\%$ ) de marcadores hematopoyéticos CD34, CD14, CD45 y HLA clase II y/o endoteliales (CD31), y finalmente deben poseer capacidad de diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Dominici *et al.*, 2006).

#### **3.4.2. Células Estromales Mesenquimales e Inmunoregulación**

Las MSCs en un sistema tanto *in vitro* como *in vivo* poseen propiedades biológicas que las vuelven candidatas ideales para emplearlas en terapia celular, las cuales comprenden: un alto potencial de diferenciación (plasticidad), capacidad de soporte hematopoyético, baja inmunogenicidad y propiedades inmunoreguladoras mediante la secreción de moléculas solubles, inhibición de la proliferación y activación de células inmunológicas, expresión de moléculas de membrana relacionadas a la inmunosupresión, participación en la vía adenosinérgica, así como con la generación de linfocitos Treg (Mora-García *et al.*, 2016; Castro-Manreza *et al.*, 2017).

Las MSCs ejercen efecto inmunoregulador sobre el sistema inmune innato (células NK) y el sistema inmune adaptativo (CDs, linfocitos B y linfocitos T) producido por contacto celular y/o mediante la secreción de factores solubles (Meisel *et al.*, 2004;

Aggarwal y Pittenger, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Spaggiari *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2007) (Figura 5).



**Figura 5: Efectos inmunoregulatorios de MSCs sobre células inmunológicas.** Citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  secretados por linfocitos T y células NK activadas, promueven la activación de la capacidad inmunoreguladora de las MSCs. IDO, PGE $_2$ , TGF- $\beta$ , IL-10, HLA-G5, PD-L1, CTLA-4, entre otras, modulan las propiedades inmunoregulatorias de MSCs sobre células NK, dendríticas, y linfocitos T (Modificada de Castro-Manreza y Montesinos, 2015).

Las MSCs ya se han empleado en ensayos clínicos debido a sus propiedades inmunoregulatoras. La enfermedad injerto contra hospedero (“GVHD” por sus siglas en inglés *Graft Versus Host Diseases*) es donde se ha utilizado (Castro-Manrreza y Montesinos, 2015). Sin embargo, aún no se conocen con exactitud los mecanismos empleados por estas células para ejercer sus propiedades inmunoregulatoras, por lo tanto, es necesario realizar más estudios dirigidos a contribuir el conocimiento biológico de las MSCs.

En las enfermedades mediadas inmunológicamente existe un proceso de inflamación en el cual participan diversos tipos de células inmunológicas, en la psoriasis se presenta este proceso por la mediación de linfocitos T, que son activados, lo cual les permite proliferar y diferenciarse para llevar a cabo su función efectora. Se ha demostrado que las MSCs poseen la capacidad de regular dichas etapas, dependiendo del estímulo al que se enfrentan. Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que es posible obtenerlas de fuentes alternas a la médula ósea y que cada fuente presenta potenciales inmunoreguladores diferentes (Castro-Manrreza *et al.*, 2014), por lo tanto, es pertinente conocer las propiedades funcionales de las MSCs provenientes de distintos sitios anatómicos que se encuentra constantemente en un estado de reto inmunológico, así como cuando este estado inmunológico es alterado.

#### **3.4.2.1. Inhibición de la activación sobre linfocitos T**

Las MSCs provenientes de tejidos neonatales como placenta (PL) o sangre de cordón umbilical (SCU), así como de adultos (MO), ejercen propiedades inmunoregulatoras en modelos *in vitro* que intervienen en la expresión de moléculas de activación temprana en linfocitos T como CD25, CD69, CD38 y CTLA-4. A la fecha, los reportes existentes del efecto de las MSCs han sido contradictorios. Estudios previos indican que las MSC-IS-MO previenen la expresión de marcadores tempranos de activación (CD25 y CD69) en un sistema de linfocitos T estimulados con un mitógeno como la fitohemaglutinina (“PHA” del inglés *Phytoheagglutinin*) (Le Blanc *et al.*, 2004; Groh *et al.*, 2005), estudios realizados sobre una población de CMSP activados con PHA en presencia de MSC-IS-MO se ve disminuida la expresión de marcadores tempranos de activación CD25, CD69 y CD38 en poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Groh *et al.*), así como de una población CD3<sup>+</sup> (Le Blanc *et al.*,

2004). Por otra parte otros grupos de investigación indican que las MSCs no afectan la expresión de estas moléculas (Krampera *et al.*, 2006; Ramasamy *et al.*, 2008).

### **3.4.2.2. Inhibición de la proliferación sobre linfocitos T**

El estudio de las propiedades inhibitorias de las MSCs IS-MO se investigó en células irradiadas y cultivadas en presencia de linfocitos T activados provenientes de una fracción total de CMSP ó de una población CD3<sup>+</sup> enriquecida. En ambos casos se observó que estas células fueron capaces de inhibir la proliferación de manera dependiente de la proporción (número de linfocitos T:número de MSCs) independientemente del modo de activación de los linfocitos T, ya sea a través de estimulación con aloantígenos (Rasmusson *et al.*, 2003; Meisel *et al.*, 2004; Krampera *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2007), por activadores policlonales inespecíficos o mitógenos como PHA (Aggarwal y Pittenger, 2005) o con activador policlonal específico como anti CD3/CD28 (Ramasamy *et al.*, 2008; Kronsteiner *et al.*, 2011; Castro-Manreza *et al.*, 2014).

Los mecanismos por los cuales las MSCs inhiben de la proliferación de linfocitos T es por contacto célula-célula, y mediante la secreción de moléculas solubles. Entre las citocinas secretadas por las MSCs se encuentran el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), IL-10, y el antígeno leucocitario humano G-5 (HLA-G5) (Meisel *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2007; Selmani *et al.*, 2008). Dentro de los mecanismos que inhiben la proliferación por contacto celular participan PD-L1, PD-L2 y HLA-G1 (Selmani *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2016). Estudios realizados en nuestro grupo de investigación han reportado mayor eficacia de la capacidad inmunoreguladora cuando se presenta la interacción célula-célula (Castro-Manreza *et al.*, 2014), sin embargo, otros autores indican que las MSCs ejercen sus funciones independientemente del contacto celular (Di Nicola *et al.*, 2002; Krampera *et al.*, 2006). La inhibición de la proliferación es un fenómeno reversible ya que los linfocitos T que estuvieron en un sistema de cocultivo, se vuelven a estimular en ausencia de MSCs y en presencia de un activador (Di Nicola *et al.*, 2002).

Se ha observado que la eficacia de las MSCs en disminuir la proliferación sobre linfocitos T activados, no tiene relación con el tipo de estímulo al que se enfrentan ya sea mitógenos (PHA) o por la estimulación directa del TCR con perlas anti-CD3/CD28

(Castro-Manrreza y Montesinos, 2015). Sin embargo, puede ser distinto el efecto de acuerdo al origen de la fuente de MSCs y a la presencia o ausencia de contacto celular (Kronsteiner *et al.*, 2011).

#### **3.4.2.3. Secreción de moléculas solubles inmunoreguladoras**

Otros de los mecanismos reportados mediante los cuales las MSCs ejercen sus propiedades inmunoreguladoras es mediante la secreción de moléculas solubles generadas por ellas mismas, por los linfocitos T activados o ambos, en un sistema de cocultivo. Por otro lado, en la literatura internacional se han publicado resultados que pueden ser interpretados como contradictorios ya que varían de acuerdo al sistema utilizado.

Se ha demostrado que las MSCs disminuyen la secreción de INF- $\gamma$ , una citocina inflamatoria, por los linfocitos T activados (Aggarwal y Pittenger, 2005; Ramasamy *et al.*, 2008; Kronsteiner *et al.*, 2011). En nuestro grupo de investigación se observó lo contrario ya que se reportó que en un sistema de cocultivo se ve aumentada la concentración de INF- $\gamma$  presente en el medio condicionado en comparación con una condición de linfocitos T CD3<sup>+</sup> en ausencia de MSCs (Castro-Manrreza *et al.*, 2014).

El TGF- $\beta$ 1, HGF, así como IL-10, son moléculas que las MSC-IS-MO producen de manera constitutiva (Ryan *et al.*, 2007) pero al estar en contacto con linfocitos T activados aumenta su producción (Groh *et al.*, 2005; Prevosto *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2007). Se ha demostrado que su bloqueo reestablece parcialmente la proliferación de linfocitos T aún en presencia de MSC-IS-MO (Di Nicola *et al.*, 2002; Groh *et al.*, 2005). Reportes previos indican que IL-10 es capaz de estimular la expresión de HLA-G5, otra molécula involucrada en la inmunoregulación de las MSCs (Selmani *et al.*, 2008), sin ser un factor determinante para la generación de linfocitos Treg (Prevosto *et al.*, 2007).

IL-4 es una molécula asociada a la capacidad inmunoreguladora de las MSCs, que se aumenta cuando los linfocitos T activados se encuentran presentes en el cocultivo, esta citocina se ha relacionado a un cambio de un fenotipo pro-inflamatorio o linfocitos Th1 a un fenotipo telorogénico o linfocitos Th2 (Aggarwal y Pittenger, 2005).

PGE2 es un mediador lipídico derivada de la conversión de ácido araquidónico a prostaglandina por acción de las enzimas COX1 y COX2, que favorece la disminución de

la proliferación sobre linfocitos T (Aggarwal y Pittenger, 2005; Ryan *et al.*, 2007). Es expresada constitutivamente en MSC-IS-MO y se incrementa en un ambiente inflamatorio (Ryan *et al.*, 2007).

IDO es una enzima involucrada en el catabolismo del triptófano a quinurenina. Se ha observado que es un factor de inhibición de la proliferación sobre linfocitos T, posiblemente por agotamiento del aminoácido esencial. Se expresa en MSCs sobre un estímulo inflamatorio en presencia de IFN- $\gamma$ , y se ha demostrado que la adición de triptófano exógeno puede restablecer la proliferación de linfocitos T aún en presencia de MSC-IS-MO (Meisel *et al.*, 2004).

Dentro de las moléculas a las cuales se les atribuye propiedades inmunoregulatoras de las MSCs se encuentran las moléculas HLA-G, que pertenecen al grupo de antígenos leucocitarios humanos (“HLA” por sus siglas en inglés *Human Leukocyte Antigen*) no clásicas, caracterizadas por un polimorfismo alélico limitado. Estas moléculas se encuentran divididas según su ubicación, en isoformas unidas a membrana (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 y HLA-G5) y solubles (HLA-G5, HLA6 y HLA-G7) (Castro-Manreza y Montesinos, 2015). Se ha demostrado la presencia de HLA-G1 y HLA-G5 en las MSC-IS-MO, así como un incremento cuando se encuentra la presencia de IL-10 en el medio, y la necesidad del contacto celular para favorecer su expresión (Selmani *et al.*, 2008).

#### **3.4.2.4. Moléculas de membrana involucradas en la inmunoregulación de MSCs**

En nuestro laboratorio hemos reportado que el contacto celular entre las MCSs y linfocitos T, en un sistema de cocultivo generan una mayor respuesta inmunoregulatora (Castro-Manreza *et al.*, 2014). La participación de moléculas de membrana mediante las vías PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, HLA-G1 y moléculas de adhesión se han reportado en MSCs para ejercer su función inmunoregulatora (Castro-Manreza y Montesinos, 2015).

La molécula PD-L1 (B7-H1 ó CD274) y su receptor PD-1 (CD279) constituyen una vía de inhibición de linfocitos T, que participa en el desarrollo de la tolerancia y la terminación de la respuesta inmunológica para evitar el daño en tejidos (Tipnis *et al.*, 2010; Davies *et al.*, 2016). Su presencia de manera constitutiva en las MSCs se ha demostrado, y es incrementada por el contacto con linfocitos T activados debido al aumento

de citocinas inflamatorias como el IFN- $\gamma$  (Castro-Manrreza *et al.*, 2014). En reportes recientes se ha propuesto la participación de PD-L2 como molécula inmunoreguladora de membrana expresada constitutivamente en las MSCs, el incremento en la expresión de PD-L1 y PD-L2, así como su liberación al medio inducida por moléculas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Davies *et al.*, 2016). La expresión de moléculas de adhesión como ICAM-I y la proteína 1 de adhesión celular-vascular (“VCAM-I” por sus siglas en inglés *Vascular cell Adhesion Protein 1*) en MSCs, se ha observado que es incrementada cuando las MSCs son expuestas a un ambiente inflamatorio en presencia de IFN- $\gamma$  (Castro-Manrreza y Montesinos, 2015).

#### **3.4.2.5. Generación de poblaciones reguladoras**

Estudios previos sugieren que las MSCs son capaces de modular la diferenciación y función de los linfocitos T, dependiendo del microambiente presente. El efecto que tienen sobre la activación de linfocitos T CD45RA<sup>+</sup> bajo condiciones inductoras Th1 ó Th2, resulta en la inhibición de secreción de IFN- $\gamma$  por la población Th1, y el incremento de la secreción de IL-4 de la población Th2 (Aggarwal y Pittenger, 2005). Otros estudios indican que las MSCs tratadas con IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , promueven la polarización de linfocitos Th17 hacia una población de linfocitos Treg, debido a que disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias como: IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , mientras promueven la secreción de IL-10 y la expresión del factor de transcripción Foxp3, esto sugiere la generación de linfocitos Treg (Ghannam *et al.*, 2010).

Estudios previos indican que la presencia de MSC-IS-MO es importante para la generación de linfocitos Treg capaces de mantener el estado inmunoregulador (Prevosto *et al.*, 2007 Ghannam *et al.*, 2010), ya que cuando se cultivan con fracciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de linfocitos T en presencia de un activador, generan diversas poblaciones de células reguladoras las cuales pueden ser diferentes entre si, que actúan en conjunto dependiendo del origen de linfocitos T empleados. Se proponen a varias moléculas como CTLA-4 (Maccario *et al.*, 2005; Castro-Manrreza *et al.*, 2014), CD25 y Foxp3, como fenotipo regulador (English *et al.*, 2009).

Se ha reportado que la expresión de Foxp3 es generada solo en la fracción CD4<sup>+</sup> de los linfocitos T, sin embargo en la fracción CD8<sup>+</sup> también se presentan poblaciones que

pueden ejercer propiedades inmunoregulatoras, lo cual nos indica que el grado de actividad regulatoria puede ser independiente de Foxp3 (Prevosto *et al.*, 2007). Estudios previos han demostrado que la generación de células reguladoras se ve aumentada cuando las MSCs fueron sometidas a un tratamiento con IFN- $\gamma$  días antes del cocultivo con linfocitos T, incrementando hasta 3 veces la población CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Tipnis *et al.*, 2010). El mecanismo por el cual estas poblaciones reguladoras generadas por la presencia de MSCs ejercen su función aun no es conocida en su totalidad, sin embargo se han involucrado varias moléculas como IL-10, TGF- $\beta$  y PGE<sub>2</sub> para ejercer dicha función (Prevosto *et al.*, 2007; English *et al.*, 2009). La molécula HLA-G5, una isoforma soluble secretada por MSCs podría también contribuir a la expansión de linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Selmani *et al.*, 2008).

#### **3.4.2.6. Vía Adenosinérgica**

Debido a la presencia de CD73 en MSCs, así como los reportes que indican también la expresión de CD39 de manera constitutiva (Kerkelä *et al.*, 2016), y el incremento de las moléculas en respuesta a un ambiente inflamatorio en presencia de linfocitos T activados (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011), se ha reportado un mecanismo novedoso involucrado en la inmunoregulación de las MSCs, el cual es mediante la vía adenosinérgica, siendo aún un mecanismo muy poco comprendido. El proceso mediante el cual la 5'-ectonucleotidasa (CD73), en conjunto con la ectonucleotidasa trifosfato di-fosfohidrolasa 1 (CD39), permite la generación de adenosina a partir de adenosina 5'-trifosfato (ATP) (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011; Kerkelä *et al.*, 2016), es mutuamente cooperativo linfocitos Treg (Kerkelä *et al.*, 2016). La adenosina es altamente inmunosupresora y participa en procesos que permiten la regulación de la inflamación al sensar altas concentraciones de ATP. La generación de adenosina se ha propuesto que participa de manera importante en MSCs provenientes de un ambiente tumoral como en el caso del cáncer cérvico uterino, apoyando en el proceso de inmunosupresión y por lo tanto evasión de la respuesta inmunológica por parte del tumor (Mora-García *et al.*, 2016).

### **3.4.3. Regulación de las propiedades inmunoreguladoras de las MSCs**

Se ha observado que para que las MSCs ejerzan sus propiedades inmunoreguladoras deben de activarse mediante citocinas proinflamatorias como el INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Ghannam *et al.*, 2010). Se ha reportado un incremento inicial en moléculas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  e IL-2 en cocultivos con CMSP activadas con anti CD3/CD28, antes de ejercer propiedades inmunoreguladoras (Cuerquis *et al.*, 2014). Esta exposición a un ambiente inflamatorio induce la expresión de moléculas anti-inflamatorias como IDO y PGE2 en el medio condicionado de los cocultivos (Meisel *et al.*, 2004; Aggarwal y Pittenger, 2005; Ryan *et al.*, 2007). El ambiente proinflamatorio también incrementa la expresión de moléculas de membrana como PD-L1 e ICAM-1 (Tipnis *et al.*, 2010).

La exposición de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  a MSCs previa al cocultivo con linfocitos T, aumenta la propiedad de generación de linfocitos Treg y de IL-10 (molécula anti-inflamatoria) (Li *et al.*, 2015). Otro estudio indica que las MSCs cuando se encuentran en una concentración adecuada de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  aumentan su capacidad inhibitoria de la proliferación sobre linfocitos T (Cuerquis *et al.*, 2014).

Otra molécula capaz de aumentar la función inmunoreguladora de las MSCs sin afectar su inmunogenicidad es la IL-17A. El tratamiento con altas concentraciones de esta molécula incrementa su capacidad de inhibir la proliferación sobre linfocitos T, así como su potencial en la generación de linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> en una población enriquecida CD3<sup>+</sup> activados con PHA (Sivanathan *et al.*, 2015).

Las MSCs ejercen sus propiedades inmunoreguladoras después de su activación previa con citocinas proinflamatorias. La presencia de estas moléculas en el medio provee un estímulo para la secreción de moléculas como IDO, la cual no es secretada cuando no se encuentra el estímulo adecuado de IFN- $\gamma$ . La pre activación de las MSCs con moléculas proinflamatorias como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-17 es una estrategia que ha sido implementada por varios grupos de trabajo para incrementar sus propiedades inmunoreguladoras (Ryan *et al.*, 2007; Tipnis *et al.*, 2010; Sivanathan *et al.*, 2015; Davies *et al.*, 2016).

Varios grupos de investigación han reportado distintas maneras de manejar la activación de las MSCs de diferentes fuentes, para poder optimizar sus propiedades inmunoregulatoras, lo que indica que aún faltan estudios para poder determinar el complejo mecanismo de las mismas (Ryan *et al.*, 2007; Castro-Manreza y Montesinos, 2015).

#### **3.4.4. MSCs derivadas de piel**

La piel consiste en 2 capas: la epidermis y la dermis, las cuales para mantener el proceso constante de regeneración albergan un gran número de células diferentes. En ambas capas de la piel se ha reportado la presencia de células de tipo progenitor, pero solo en la dermis se ha propuesto la presencia de MSCs, estas células han sido localizadas en distintas estructuras de la piel como folículo capilar, vaso sanguíneo y receptores sensorios. Expresan los marcadores establecidos por la ISCT, es decir, positivos a CD90, CD105 y CD73 y negativos a marcadores hematopoyéticos como: CD34, CD31, CD45 y HLA-DR (Bartsch *et al.*, 2005; Toma *et al.*, 2005; Klimczak y Kozłowska, 2016) proponiendo a la dermis como una fuente de obtención de MSCs (Orciani *et al.*, 2017).

Análisis *in situ* han revelado la presencia de células con marcadores CD73, CD90, CD105, CD274 y SSEA-4 en diferentes tipos de células dermales, mostrando diferencias en el potencial de diferenciación y de proliferación de acuerdo a los distintos marcadores presentados (Vaculik *et al.*, 2012).

Las MSCs provenientes de dermis al igual que de otras fuentes se han reportado que poseen propiedades inmunoregulatoras cuando se encuentran en exposición de un ambiente inflamatorio, obteniendo la capacidad de inhibir la proliferación sobre linfocitos T en una manera proporción dependiente (MSCs:linfocitos T), y promueven la expresión de HGF, IDO, IL-10, TGF- $\beta$ , así como de TNF- $\alpha$  (Najar *et al.*, 2016).

La epidermis es la capa expuesta de la piel, la cual se encuentra en regeneración constante para ejercer su función protectora contra el ambiente. Está conformada por estratos bien organizados y con funciones particulares, donde en el estrato basal se presenta una población de células mitóticamente activas, que son las responsables de la generación de queratinocitos, esta población basal alberga una población celular que al cultivarse *in*

*in vitro* presentan marcadores de superficie tipo MSCs (Zhang *et al.*, 2012; Klimczak y Kozłowska, 2016) con alto potencial de proliferación (Huang *et al.*, 2013), aunque es aún incompleta su caracterización, por lo tanto son convenientes más estudios para llegar a un resultado que nos indique que la epidermis alberga una población de MSCs, así como su localización y sus propiedades biológicas.

#### **3.4.5. MSCs derivadas de piel en zonas afectadas por psoriasis**

La presencia de MSCs en una zona afectada por psoriasis fue reportado por primera vez por Orciani y colaboradores en el 2011, en este trabajo se reportó que dichas células presentan características similares a las MSC-IS-MO en cuanto a morfología, marcadores de superficie y capacidad de diferenciación. En este estudio donde se comparó las MSC-Pso-DL, MSCs provenientes de dermis de dermatitis atópica y MSC-IS-D, se observó que la expresión de VEGF fué encontrada en mayor expresión en las MSCs de la periferia de la lesión psoriática y en Pso-DL, así como MSCs provenientes de Pso-DNL en comparación con MSC-IS-D (Orciani *et al.*, 2011).

Orciani y colaboradores, reportaron que la sintetasa de óxido nítrico inducible (“iNOS” por sus siglas en inglés *inducible Nitric Oxide Synthase*) se encuentra incrementada en las MSC-Pso-DL en comparación con MSC-IS-D, proponiendo que la expresión de estos mediadores, reducen la capacidad antioxidante y aumenta el potencial de angiogénesis de estas células provenientes de un paciente con psoriasis contribuyendo al desarrollo de la patología (Orciani *et al.*, 2011).

Estudios previos indican que las MSC-Pso-DL presentan una secreción de IL-11 aumentada y de HGF disminuida, comparadas con MSC-IS-D en ausencia de un estímulo proinflamatorio, no mostrando diferencias en las concentraciones de TNF- $\alpha$  ni de IL-10 (Liu *et al.*, 2013). Estas condiciones se mantienen en presencia de linfocitos T activados, sin encontrarse diferencias en la secreción de TGF- $\beta$ . Se ha reportado que MSC-IS-D y MSC-Pso-DL inhiben la proliferación sobre linfocitos T, de una manera no significativa en comparación con una condición en ausencia de MSCs, observándose más evidente este efecto en aquellas derivadas de IS-D (Liu *et al.*, 2014).

Otros estudios demuestran que las MSC-Pso-DL presentan una expresión mayor de genes involucrados en una respuesta Th1 y Th17 como lo son: IFN- $\gamma$ , CCR5, CXCL9, CXCL10, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-23A, CCL2, CCL20, CXCL2, CXXL5, IL-17C, IL-17F, IL-17RA, IL-21, y TLR2 cuando fueron comparados con MSC-IS-D (Campanati *et al.*, 2014). Otro estudio indicó que estas últimas expresan de manera constitutiva el transcrito para IL-4 una citocina anti-inflamatoria (Orciani *et al.*, 2017). Por lo tanto, el conocimiento de las propiedades inmunoreguladoras de MSCs provenientes de piel en procesos de alteración inflamatoria se debe profundizar, para entender la participación de estas células en patologías de este órgano.

#### **4. ANTECEDENTES**

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica en la piel. Además de las células del sistema inmunológico que participan en la patogénesis de la misma, se ha identificado la presencia de MSCs en las zonas afectadas de dichos pacientes particularmente en dermis, sin embargo, a la fecha no se sabe si también en la epidermis hay presencia de ellas, así como su participación en el desarrollo de dicha patología.

En nuestro laboratorio hemos evaluado la capacidad de inmunoregulación de MSCs provenientes de diferentes fuentes como MO, sangre de cordón umbilical (SCU) y placenta (PL) sobre linfocitos T CD3<sup>+</sup> (Castro-Manreza *et al.*, 2014). Además, hemos obtenido poblaciones de células adherentes en cultivos *in vitro* de epidermis y dermis de la piel de pacientes con psoriasis (Hernández-Cristino, tesis de pregrado 2016) para ser caracterizadas de acuerdo con los criterios establecidos por la ISCT para determinar si pueden ser consideradas como MSCs. De igual manera, a la fecha no se sabe si al determinar la presencia de estas células en la piel lesionada de los pacientes con psoriasis, presentan propiedades inmunoreguladoras disminuidas que pudieran contribuir al desarrollo de la enfermedad.

Con base en estos antecedentes en este estudio pretendemos evaluar la capacidad de inmunoregulación de las MSCs de pacientes con psoriasis sobre linfocitos T en términos de su potencial de inhibición de la proliferación, efecto sobre marcadores de iniciación de la activación, expresión de moléculas inmunosupresoras (membranales y secretadas) y generación de linfocitos T reg.

## **5. HIPÓTESIS**

Se espera que las MSCs de la zona lesionada de piel de pacientes con psoriasis a diferencia de las MSCs provenientes de zonas no lesionadas o de individuos sanos, tendrán reducida la capacidad de inhibir la proliferación y activación de linfocitos T y no favorecerán la producción de moléculas de membrana, citocinas inmunoreguladoras ni generación de linfocitos Treg.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo General**

- Evaluar la capacidad inmunoreguladora sobre linfocitos T de MSCs provenientes de la piel de pacientes con psoriasis.

### **6.2. Objetivos Particulares**

- Realizar la caracterización morfológica, inmunofenotípica y capacidad de diferenciación de las MSCs provenientes de piel pacientes con psoriasis.
- Evaluar el efecto de las MSCs sobre la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> obtenidos de CMSP y de una población enriquecida.
- Determinar el efecto de las MSCs sobre la expresión de moléculas de iniciación de la activación: CD25, CD69 y CTLA-4 en linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados.
- Determinar el efecto de los linfocitos T activados sobre la expresión de la molécula inmunosupresora PD-L1 en MSCs.
- Determinar el efecto de las MSCs sobre la secreción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 en presencia de linfocitos T activados.
- Determinar el efecto de las MSCs sobre la generación de linfocitos Treg.

## **7. METODOLOGÍA**

Las biopsias fueron obtenidas de pacientes con psoriasis que acudieron al servicio dermatológico del hospital “Adolfo López Mateos” perteneciente al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), valorados con el sistema de medición del índice de severidad y área de la psoriasis (“PASI” por sus siglas en inglés *Psoriasis Area and Severity Index*). Las biopsias fueron tomadas con sacabocados de 5mm de diámetro. Se tomó piel de una región lesionada y de piel no lesionada cercana a la lesión. Se pidió que 15 días antes de la toma de la biopsia se suspendiera el tratamiento, en aquellos pacientes que lo tengan. La piel sana fue obtenida a partir de individuos sometidos a cirugías gastrointestinales practicadas en el hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

### **7.1. Separación de capas de la piel y cultivo de MSCs**

Las biopsias de piel se colocaron en un tubo que contuvo dispasa II 1mg/mL (Proteasa grado II, Roche) y 2mL de RPMI 1640 (GIBCO, Invotrogen) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen, Gibco) al 10%, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se separó la epidermis de la dermis y ambas se colocaron por separado en placas de cultivo (35mm X 10mm, Corning) con medio RPMI 1640 suplementado, durante 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, para facilitar la separación de las células del tejido.

Después de 17- 20 días de cultivo, las células adheridas a la placa se despegaron y se sembraron en cajas Petri de 100mm (Cell Culture Dish, Corning) con medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (Ig-Dulbecco’s Modified Eagle Media) (Gibco) suplementado con 10% de SFB, 10µL/ml de penicilina-estreptomicina, 10µL/ml de gentamicina y 10µL/ml de L-glutamina. Cuando llegaron a una confluencia del 80% las células se despegaron para su caracterización morfológica, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación.

### **7.2. Análisis Morfológico**

Para determinar su morfología se sembraron  $5 \times 10^4$  células en una caja petri de 35mm y cuando las células llegaron a una confluencia del 60-70% se desechó el medio, se adicionó agua destilada y se le realizaron 2 lavados. Posteriormente la caja se tiñó con azul de Toluidina (Sigma-Aldrich) previamente filtrada durante 20 minutos. La caja se lavó con

agua destilada en 2 ocasiones y se dejó secar. Finalmente se observó bajo el microscopio con 1mL de agua destilada, se distinguió una morfología fibroblastoide como se ha establecido previamente en nuestro laboratorio.

### **7.3. Inmunofenotipo**

Para determinar el inmunofenotipo de las MSCs, se sembraron  $1-3 \times 10^5$  células en una caja petri de 100mm y, cuando las células llegaron a una confluencia del 80-85% se procedió a realizar la obtención de las mismas mediante separación enzimática (Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red) (Gibco). Se realizó un primer lavado de células con solución salina, un segundo lavado con buffer PBS- EDTA 1mM, y un tercer lavado con buffer PBS-EDTA 1mM-3% SFB, marcándolos con anticuerpos de acuerdo con sugerencias del proveedor ( $1 \mu\text{L}$  por  $1 \times 10^6$  células) 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Para determinar el inmunofenotipo de las MSCs obtenidas, se analizó la expresión de antígenos de superficie: CD105, CD90, CD73, CD13, HLA-ABC, HLA-DR, CD45, CD34, CD31 y CD14 mediante citometría de flujo en un equipo FACS Canto II (BD).

### **7.4. Capacidad de diferenciación.**

***Inducción osteogénica con técnica fosfatasa alcalina.*** Las MSCs se cultivaron en medio para diferenciación osteogénico Stem Cells Kits™ (STEMCELL Technologies), durante 21 días (con cambios de medio 2 veces por semana). Al terminar el periodo de inducción, se enjuagó con agua destilada y se se adicionó metanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) durante 5 minutos, seguido de un lavado de 1 min. con agua desionizada. Consecuentemente se agregó el sustrato SIGMA FAST BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium) ( $10\text{mg}/350\mu\text{L}$ ) (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos. Finalmente se realizaron 3 enjuagues con agua desionizada.

***Inducción adipogénica con técnica de rojo oleoso.*** Las MSCs se cultivaron en medio para diferenciación adipogénica Stem Cells Kits™ (STEMCELLS technologies) durante 21 días, realizando cambios de medio 2 veces por semana. Al terminar el periodo de inducción, se retiró el medio de la caja y se enjuagó con agua destilada. Posteriormente, se adicionó formol buffer al 10% por 5 min., al término de este tiempo, el formol buffer se desechó y se agregó propilenglicol absoluto por 5min., después se tiñó con rojo oleoso

durante 1 hora a una temperatura de 60°C. Al término de la hora se lavó con propilenglicol al 85% durante 2 min. Finalmente, se contratiñó con hematoxilina de Harris.

***Inducción condrogénica con técnica de azul Alciano.***  $3 \times 10^5$  MSCs fueron centrifugadas a 150g durante 5 min. para formar un botón celular en el fondo del tubo (micromasa). Se cultivó en 500  $\mu$ L de medio diferenciación condrogénico (Cambrex Bio Science) suplementado con 10ng de TGF- $\beta$ 3 (Peprotech) por 28 días y se realizaron cambios de medio 2 veces a la semana. Al terminar los 28 días de cultivo con medio de diferenciación condrogénico, se desechó el medio, se fijó la micromasa con formaldehído y se deshidrató con diluciones de etanol (al 70%, 80%, 90% y absoluto) y xilol grado histológico durante 30 minutos con dos repeticiones cada una. La micromasa se embebió en parafina y se realizaron cortes histológicos con ayuda de un micrótopo. La detección de la diferenciación condrogénica se realizó con las tinciones de azul Alciano para observar la positividad a proteoglicanos sulfatados (matriz extracelular condrogénica).

#### **7.5. Evaluación de capacidad inmunoreguladora**

***Obtención de CMSP.*** Se obtuvieron CMSP de individuos sanos mediante gradiente de densidad (Lymphopred, Axis-Shield). Las CMSP se sembraron en medio RPMI (RPMI 1640, 10% SFB, 2 mM L-glu, 100 U/ml penicilina, 100  $\mu$ g/ml estreptomina y 100  $\mu$ g/ml gentamicina) por 24 horas.

***Obtención de linfocitos T CD3<sup>+</sup>.*** A partir de muestras de sangre periférica de individuos sanos se obtuvieron CMSP mediante gradiente de densidad (Lymphopred, Axis-Shield). Los linfocitos T CD3<sup>+</sup> se enriquecieron empleando CD3 MicroBeads human con columnas MS MACS (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La pureza celular se determinó mediante citometría de flujo. En los experimentos se emplearon suspensiones con pureza mayor al 80%. Los linfocitos T CD3<sup>+</sup> se sembraron en medio RPMI (RPMI 1640, 10% SFB, 2 mM L-glu, 100 U/ml penicilina, 100  $\mu$ g/ml estreptomina y 100  $\mu$ g/ml gentamicina) por 24 horas.

***Proliferación sobre linfocitos T.*** Para determinar la actividad inhibitoria de las MSCs provenientes de la piel de pacientes con psoriasis sobre la proliferación de linfocitos T, se realizaron cocultivos de MSCs/CMSP en contacto celular (en una proporción 1:2), y de

MSCs/linfocitos T enriquecidos CD3<sup>+</sup> (en una proporción 1:1) en placas de 24 pozos. Se marcó a los linfocitos T con 5μM de succinimidil éster de carboxifluoresceína (“CFSE” por sus siglas en inglés *CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester*), previo a la estimulación con PHA (5μg/mL) (Sigma-Aldrich) ó perlas anti-CD3/CD28 (12.5μL de perlas: 1x10<sup>6</sup> linfocitos T CD3<sup>+</sup>) (Invitrogen). Como control positivo se sembraron linfocitos T estimulados en ausencia de MSCs considerándolos como el 100% de la respuesta a la proliferación. Al séptimo día para cocultivos con CMSP ó al tercer día para aquellos con linfocitos T CD3<sup>+</sup> enriquecidos. Se colectaron las células no adherentes y mediante citometría de flujo, se detectaron las poblaciones de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Se evaluó el porcentaje de proliferación de acuerdo con los niveles de CFSE en las células estimuladas.

***Expresión de moléculas de iniciación de la activación en linfocitos T:*** Para determinar el efecto de las MSCs sobre la expresión de marcadores de activación temprana en linfocitos T, se realizaron cocultivos de MSCs/CMSP en placas de 24 pozos (en una proporción 1:2). Se adicionó 5μg/mL de PHA como activador. La expresión de estas moléculas en linfocitos T estimulados en ausencia de MSCs fué considerada como el control positivo y su expresión basal en linfocitos T sin estimulación y sin MSCs, como control negativo. Al segundo día de cocultivo se colectaron las células no adherentes y mediante citometría de flujo se detectaron los marcadores CD25, CD69 y CTLA-4 en la población de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> estimulados.

***Expresión de moléculas de membrana inmunosupresoras en MSCs y linfocitos T:*** Para determinar la respuesta de las MSCs sobre la expresión de moléculas de membrana inmunosupresoras, se realizaron cocultivos de MSCs/CMSP (en una proporción 1:2). Los cocultivos se realizaron en placas de 24 pozos y se estimularon con PHA (5μg/mL). Se consideró el porcentaje de la expresión basal de PD-L1 en MSCs sin estímulo y sin CMSP como control. Mediante citometría de flujo se analizó la expresión de PD-L1 en MSCs al séptimo día de cocultivo. La expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados en ausencia de MSCs fue considerada como el control positivo y su expresión basal en linfocitos T sin estimulación y sin MSCs, como control negativo. Mediante citometría de flujo se analizó la expresión de CTLA-4 en linfocitos T al sexto día de cocultivo.

***Generación de linfocitos Treg.*** Para determinar el efecto de las MSCs sobre la generación de poblaciones de linfocitos Treg, se realizaron cocultivos de MSCs/CMSP en placas de 48 pozos y en contacto celular (en una proporción 1:2). Se adicionó PHA (5µg/mL) como activador. La generación de linfocitos Treg estimulados en ausencia de MSCs fue considerada como el control positivo y su generación basal en linfocitos T sin estimulación y sin MSCs, como control negativo. En el sexto día de cocultivo se colectaron las células no adherentes y mediante citometría de flujo se evaluó la generación de linfocitos Treg con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>high</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>.

***Cuantificación de moléculas solubles.*** Para determinar la concentración de moléculas solubles secretadas, se obtuvieron los sobrenadantes de varias condiciones de cultivo: linfocitos T CD3<sup>+</sup> en ausencia de MSCs y en ausencia de estímulo (control negativo); linfocitos T CD3<sup>+</sup> en ausencia de MSCs y en presencia de estímulo (control positivo); linfocitos T CD3<sup>+</sup> en presencia de estímulo y en presencia de MSCs (proporción 1:1). Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C hasta su uso. La determinación de citocinas se realizó por perlas CBAs (BD, Bioscience) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se mezclaron 10µL de perlas de captura que reconocen a las citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-10 e IL-4; esta mezcla se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Durante ese tiempo, mediante diluciones seriales se preparó la curva estándar de cada una de las citocinas (0-5000 pg/mL). Posteriormente, 50µL de cada sobrenadante o de cada una de las concentraciones de la curva estándar, se mezclaron con 50µL de las perlas de captura y los tubos se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente protegidos de la luz. Después se realizó un lavado y el botón fue resuspendido en 200µL del buffer. Las muestras se analizaron inmediatamente en el citómetro con una baja velocidad de adquisición.

### **7.6. Análisis Estadísticos**

Los datos son expresados como la media/mediana ± error estándar de la media (SEM), calculada de 2-6 experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS statistics 21. La comparación entre los grupos se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis seguido por Mann-Whitney U test. Valores de p <0.05 se consideraron significativos.

## **8. RESULTADOS**

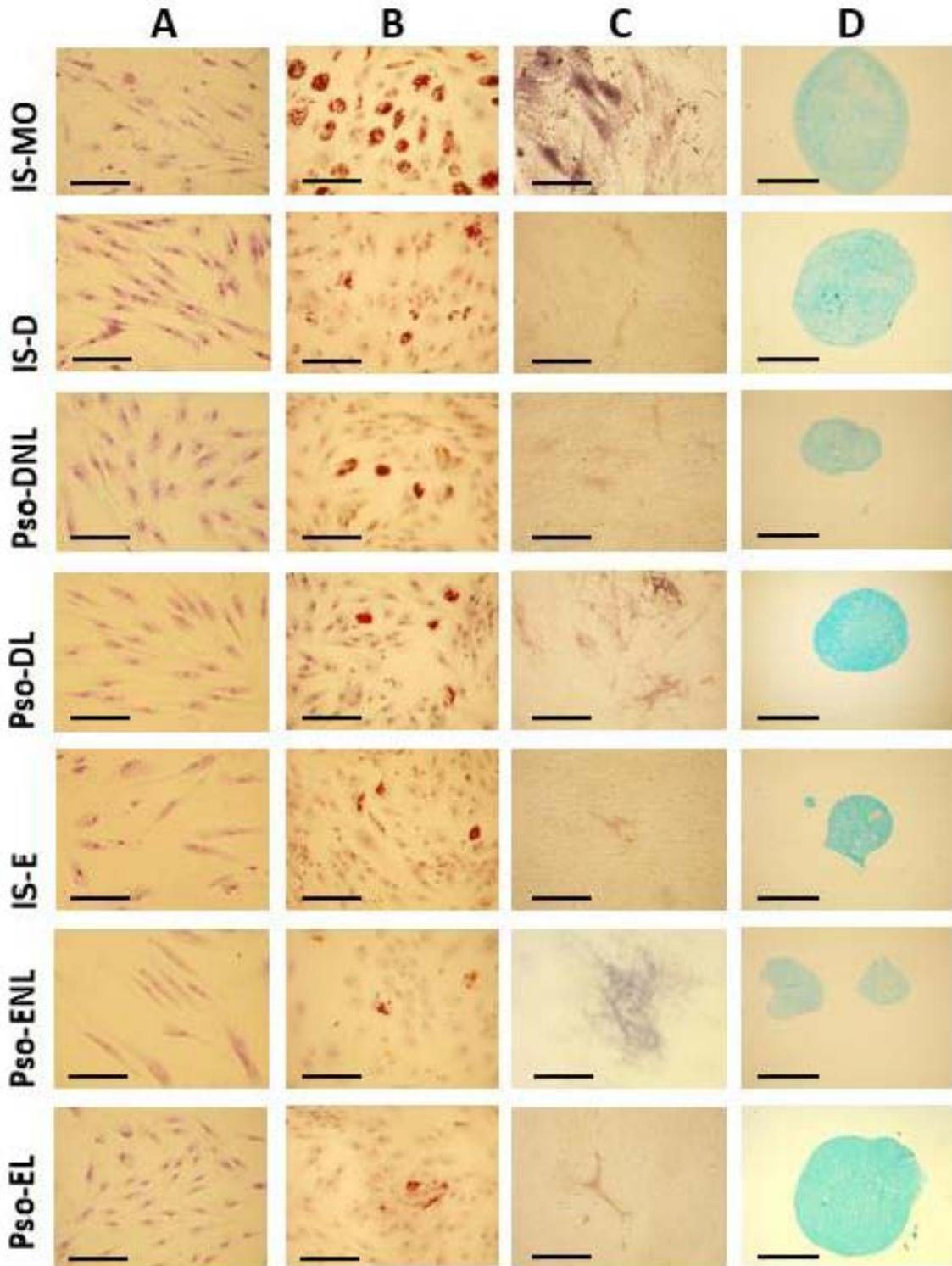
### **8.1. Las MSCs provenientes de piel de pacientes con psoriasis, presentaron morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación similares.**

Los resultados obtenidos de la caracterización de las MSC obtenidas de IS-MO (n=9), IS-D (n=5), Pso-DNL (n=5), Pso-DL (n=5), IS-E (n=5), Pso-ENL (n=2) y Pso-EL (n=5) demostraron que nuestras poblaciones celulares presentaron morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación similares a los reportados previamente en nuestro grupo de trabajo (Montesinos *et al.*, 2009). Se observó un alto porcentaje de los marcadores de superficie característicos para MSCs (CD105, CD90 y CD73) en las fuentes evaluadas. La expresión de la molécula CD13 permanece constantemente alto en todas las fuentes evaluadas (>98%). Se presentó una diferencia en HLA-ABC entre todas las muestras evaluadas, siendo menores todas las fuentes de piel en comparación con IS-MO. Se encontró menor porcentaje en las fuentes provenientes de individuos sanos. Se encontró un porcentaje negativo de HLA-DR en todas las fuentes evaluadas, así como de marcadores hematopoyéticos CD45, CD34 y CD14, y endotelial CD31 (Tabla 1).

Las MSCs de todas las fuentes evaluadas presentaron morfología fibroblastoide característica de este tipo de células (Figura 6A), similares a IS-MO. Así mismo las MSCs de piel evaluadas tuvieron la capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica (Figura 6 B-D), de manera similar entre sí. Sin embargo, la diferenciación adipogénica y osteogénica de todas las fuentes de piel se observa disminuida en comparación con IS-MO.

**Tabla 1: Análisis de Inmunofenotipo de MSCs provenientes de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis.** Resultados de expresión de marcadores de superficie representados en media y desviación estándar correspondiente al porcentaje de células positivas para cada marcador.

Marcador	IS-MO	IS-D	Pso-DNL	Pso-DL	IS-E	Pso-ENL	Pso-EL
	(n=9)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=2)	(n=5)
CD105	90±13	96±4	99±1	99± 1	98±3	97±4	99±2
CD90	85±15	98±2	99±1	99±1	99±1	99±1	99
CD73	97±3	89±17	98±2	99±1	69±30	47±64	79±28
CD13	98±1	98±4	99	99±1	98±2	99±1	99
HLA-ABC	94±9	26±26	86±20	90±8	18±18	43±60	37±41
HLA-DR	3±3	1±1	2±2	1±1	1±1	1	1
CD45	1±1	1±1	1±1	1± 1	1±1	1±1	1
CD34	0	1±1	9±5	4± 4	2±2	2±1	1±1
CD31	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1	1
CD14	2±2	1±1	6±6	2±1	0	2±2	1±1



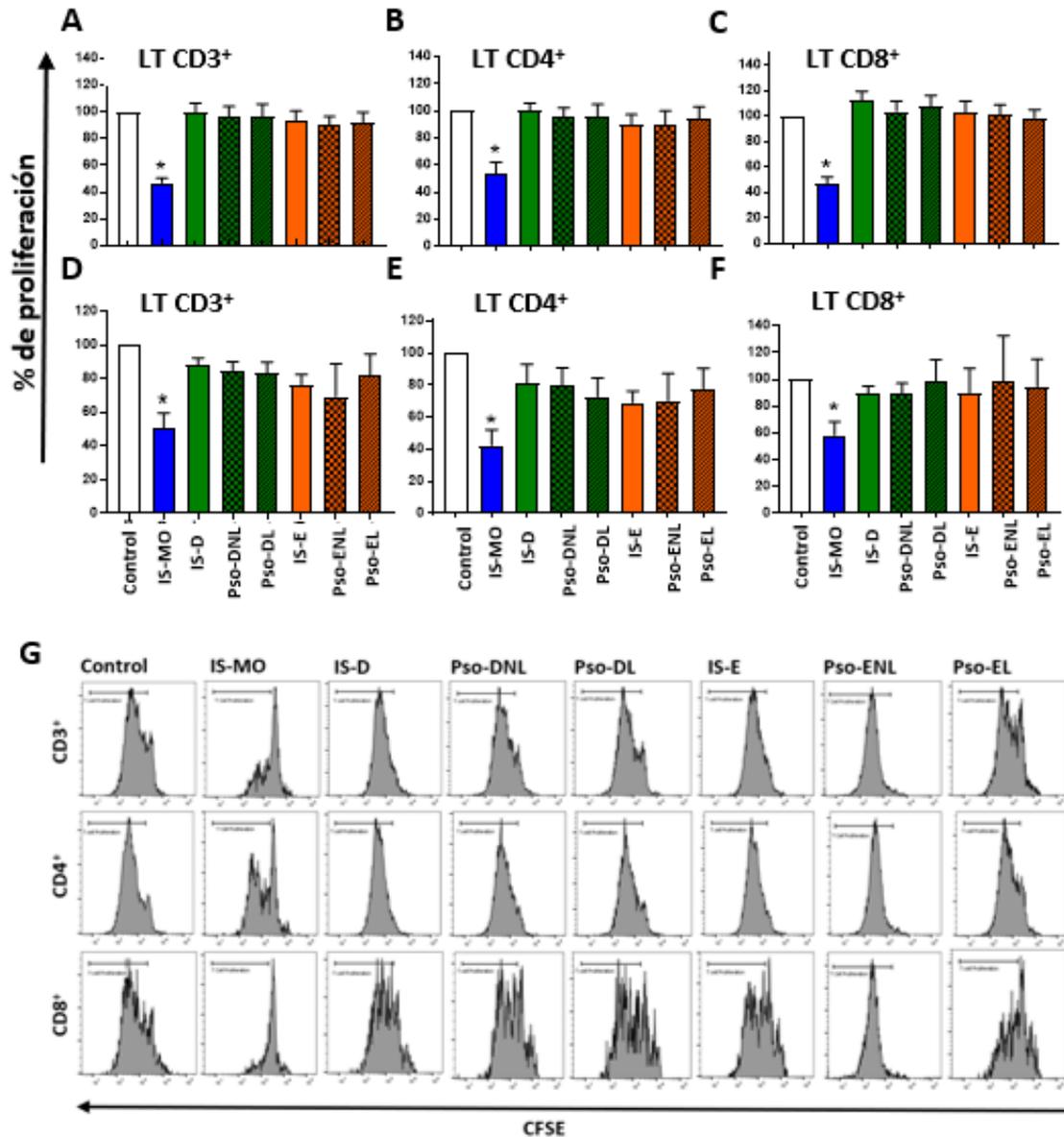
**Figura 6: Morfología y capacidad de diferenciación de MSCs de piel de individuos sanos y pacientes con psoriasis.** (A) Apariencia bajo microscopio de la morfología de los distintos tipos celulares, se observó morfología de tipo fibroblastoide. (B) Diferenciación adipogénica indicada por la acumulación de vacuolas lipídicas neutras, teñidas con rojo oleoso. (C) Diferenciación osteogénica indicada por la reacción con

fosfatasa alcalina. (D) Diferenciación condrogénica indicada por la coloración de matriz extracelular con azul alciano en criosecciones de micromasas. Barra de escala 300µM.

### **8.2. Las MSCs provenientes de la piel de pacientes con psoriasis no inhiben la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> ni de CD8<sup>+</sup>.**

En nuestro laboratorio hemos demostrado que las MSCs obtenidas a partir de diferentes fuentes como IS-MO, SCU y PL inhiben la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> enriquecidos, activados con perlas anti CD3/CD28 (Castro-Manrreza *et al.*, 2014). En otro estudio, nuestro grupo de investigación demostró que se puede evaluar dicho mecanismo sobre una población de CMSP y también se encontró que las MSC-IS-MO son capaces de inhibir la proliferación sobre linfocitos T, (Hernández-Estévez, tesis de maestría 2016). Es importante señalar que en ambos modelos experimentales el contacto celular fué necesario para llevar a cabo esta función. Con base en los estudios antes mencionados, decidimos analizar el efecto directo que tienen las MSCs sobre una población de CMSP, así como en una población enriquecida en linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Obtuvimos una pureza del 88% después del enriquecimiento. La proliferación de linfocitos T en ausencia de MSCs se consideró como el 100% de la proliferación. En la figura 7A-C, se observa que las MSCs de IS-MO disminuyen significativamente la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> (47.07 % ±7.8, p<0.5) (Figura 7A), CD4<sup>+</sup> (53.30 % ±19.6, p<0.5) (Figura 7B) y CD8<sup>+</sup> (46.94 % ±11.8, p<0.5) (Figura 7C) en una población CD3<sup>+</sup> enriquecida, sin embargo, las MSCs provenientes de IS-D, Pso-DNL, Pso-DL, IS-E, Pso-ENL o Pso-EL no disminuyen la proliferación sobre linfocitos T CD3<sup>+</sup> (99.81% ±16.2, 97.02%±17.6, 96.62%±22.6, 93.39%±18.1, 89.94%±13.2 y 92.46%±17.92 respectivamente) (Figura 7A), de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (99.99%±13.8, 95.47%±16.4, 96.16%±21.2, 90.30%±16.9, 89.48%±21.4 y 94.49%±21.0 respectivamente) (Figura 7B) ó de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (111.97%±18.0, 103.77%±19.2, 107.42%±21.6, 103.15%±20.4, 101.06%±15.7 y 98.86%±15.3 respectivamente) (Figura 7C). Debido a que las MSCs provenientes de piel no tienen la capacidad de inhibir la proliferación sobre linfocitos T de una población CD3<sup>+</sup> enriquecida, evaluamos si la presencia de otras células inmunes como linfocitos B, monocitos o células dendríticas podrían influir en este efecto como lo previamente reportado (Kronsteiner *et al.*, 2011). En nuestros resultados encontramos que las MSCs provenientes de IS-MO mantienen el efecto

inhibitorio de la proliferación sobre linfocitos T provenientes de una población de CMSP, sobre poblaciones de linfocitos T CD3<sup>+</sup> (50.35 % ±20.6, p<0.5) (Figura 7D), CD4<sup>+</sup> (42.68 % ±21.4, p<0.5) (Figura 7E) y CD8<sup>+</sup> (58.66 % ±21.8, p<0.5) (Figura 7F). Contrariamente, las MSCs provenientes de IS-D, Pso-DNL, Pso-DL, IS-E, Pso-ENL y Pso-EL continúan manteniendo su deficiente capacidad de inhibición sobre la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> (87.92% ±9.5, 84.86%±11.4, 82.80%±15.5, 76.34%±13.2, 69.47%±33.3 y 81.71%±25.7 respectivamente) (Figura 7D), linfocitos T CD4<sup>+</sup> (81.08%±26.5, 80.02%±24.1, 72.96%±25.5, 69.20%±16.0, 69.05%±41.2 y 78.06%±27.7 respectivamente) (Figura 7E) ó sobre linfocitos T CD8<sup>+</sup> (89.76%±11.9, 89.08%±18.0, 98.66%±36.3, 90.16%±40.8, 99.15%±47.5 y 94.74%±45.8 respectivamente) (Figura 7F). Estos resultados nos indican que las MSCs provenientes de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis no poseen la propiedad de inhibición de la proliferación sobre linfocitos T ya sea a partir de una población CD3<sup>+</sup> enriquecida o de CMSP, manteniendo esta deficiente capacidad inhibitoria sin diferencias significativas entre cada una de las fuentes evaluadas. Es importante mencionar que las MSC-IS-MO, mantuvieron el efecto inhibitorio de proliferación sobre linfocitos T en ambas condiciones de obtención de linfocitos T (Figura 7G).



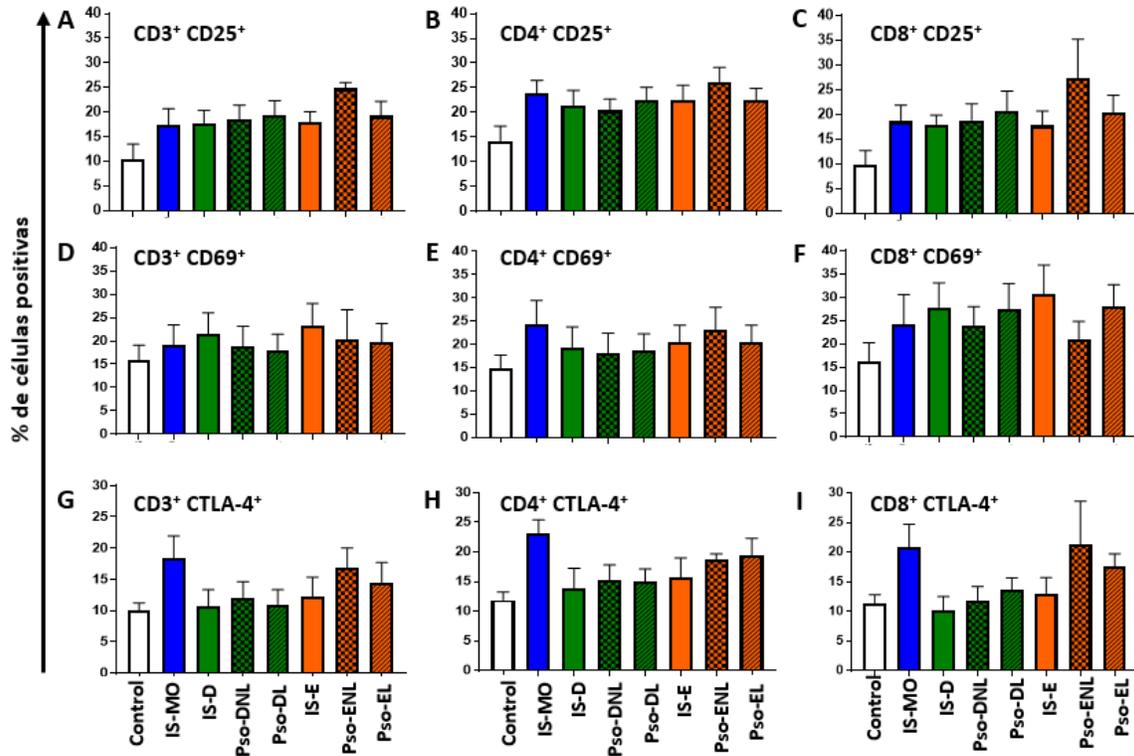
**Figura 7: Las MSCs provenientes de la piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis, no inhiben la proliferación de linfocitos T.** Linfocitos T CD3<sup>+</sup> enriquecidos y activados con anti CD3/CD28 o bien CMSP activadas con PHA, se cultivaron en presencia de MSCs de IS-MO (n=6) (barra azul), IS-D (n=6) (barra verde), Pso-DNL (n=6) (barra verde cuadriculada), Pso-DL (n=6) (barra verde rayada), IS-E (n=6) (barra naranja), Pso-ENL (n=4) (barra naranja cuadriculada) y Pso-EL (n=6) (barra naranja rayada) permitiendo el contacto celular. La proliferación de linfocitos T activados en ausencia de MSCs se consideró como el control positivo (n=8) (100%) (barra blanca). Se muestra la media  $\pm$  SEM de proliferación de linfocitos T enriquecidos CD3<sup>+</sup> en relación 1:1 (MSCs:linfocitos T) al tercer día de co-cultivo (A) sobre linfocitos T CD3<sup>+</sup>, (B) CD4<sup>+</sup>, (C) CD8<sup>+</sup>, y a partir de CMSP en relación 1:2 (MSCs:CMSP) al séptimo día de cocultivo (D) sobre linfocitos T CD3<sup>+</sup>, (E) CD4<sup>+</sup> y (F) CD8<sup>+</sup>. (G) Representación de histogramas de la proliferación sobre linfocitos T mediante su concentración de CFSE cultivadas en presencia de MSCs. \*Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.05$ .

### **8.3. Las MSCs derivadas de pacientes con psoriasis no afectan la expresión de moléculas de respuesta de activación temprana CD25, CD69 y CTLA-4.**

Debido a que las MSCs provenientes de la piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis no presentan inhibición de la proliferación sobre linfocitos T, decidimos evaluar si las MSCs estudiadas presentan deficiencias en otras propiedades inmunoregulatoras reportadas para esta población celular. Se han reportado estudios contradictorios sobre el efecto que tienen las MSCs en la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4 moléculas involucradas en la respuesta de inicio de la activación de los linfocitos T (Castro-Manrreza y Montesinos, 2015). La expresión de las moléculas antes mencionadas en ausencia de MSCs se consideró como el control positivo. Observamos que la expresión de CD25 en linfocitos T CD3<sup>+</sup> no se ve afectada por la presencia de MSCs de IS-MO, IS-D, Pso-DNL, Pso-DL, IS-E, Pso-ENL ó de Pso-EL (17.4%±8.1, 17.7%±6.4, 18.6%±7.1, 19.3%±7.5, 17.9%±5.4, 24.8%±1.7 y 19.2%±7.3 respectivamente) (Figura 8A); de igual que en CD4<sup>+</sup> (23.8%±6.5, 21.4%±7.7, 20.4%±5.6, 22.6%±6.1, 22.4%±7.6, 26.3%±4.0 y 22.5%±6.2 respectivamente) (Figura 8B) ó CD8<sup>+</sup> (18.6%±7.9, 18.0%±4.6, 18.8%±8.1, 20.7%±10.1, 17.7%±7.3, 27.3%±11.2 y 20.5%±8.5 respectivamente) (Figura 8C). También observamos que la expresión de CD69 en linfocitos T CD3<sup>+</sup> no se ve afectada por la presencia de MSCs de IS-MO, IS-D, Pso-DNL, Pso-DL, IS-E, Pso-ENL ó de Pso-EL (19.2%±10.3, 21.4%±11.3, 18.9%±10.4, 18.1%±8.2, 23.4%±11.3, 20.2%±9.2 y 19.6%±10.2 respectivamente) (Figura 8D). Comportamiento similar lo observamos en la fracción CD4<sup>+</sup> (24.4%±12.2, 19.2%±11.3, 18.2%±10.4, 18.7%±8.8, 20.4%±9.1, 23.0%±7.1 y 20.4%±9.2 respectivamente) (Figura 8E), ni en CD8<sup>+</sup> (24.1%±15.7, 27.9%±12.9, 23.9%±10.2, 27.5%±13.5, 30.6%±15.6, 21.0%±5.4 y 28.0%±11.5 respectivamente) (Figura 8F).

La expresión de CTLA-4 un regulador negativo en la activación de linfocitos T no se ve afectada por la presencia de MSCs IS-D, Pso-DNL, Pso-DL, IS-E, Pso-ENL ó de Pso-EL sobre linfocitos T CD3<sup>+</sup> (12.8%±4.6, 14.4%±2.9, 13.0%±3.6, 14.6%±5.6, 17.0%±4.3, y 16.9%±5.9 respectivamente) (Figura 8G), CD4<sup>+</sup> (16.2%±6.6, 17.5%±3.8, 17.0%±1.6, 18.1%±6.3, 18.8%±1.3 y 21.7%±4.7 respectivamente) (Figura 8H), o CD8<sup>+</sup> (11.7%±4.9, 13.6%±4.4, 15.1%±3.7, 14.8%±5.7, 21.4%±10.2 y 17.6%±5.3 respectivamente) (Figura 8I). Sin embargo, se observa una tendencia de incremento en la expresión de CTLA-4 en presencia de MSCs derivadas de IS-MO, aunque no es significativa, en linfocitos T CD3<sup>+</sup>,

CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (25.8%±1.6, 23.2%±5.4 y 23.4%±7.9 respectivamente) (Figura 8 G-I). Estos datos nos sugieren que las MSCs derivadas de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis mantienen su comportamiento similar entre todas las fuentes evaluadas, sin mostrar efecto alguno sobre la expresión de moléculas involucradas en el inicio de de la activación de los linfocitos T.

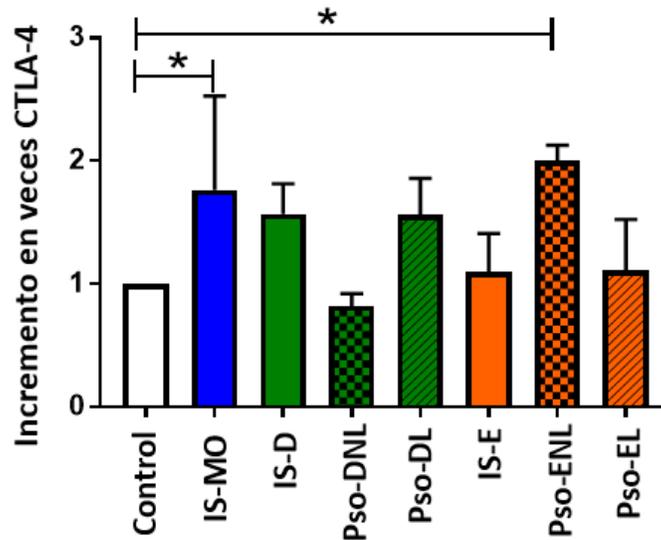


**Figura 8: Efecto de las MSCs sobre la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4 en linfocitos T.** CMSP activadas con PHA se cultivaron en presencia de MSCs provenientes de IS-MO (n=6) (barra azul), IS-D (n=6) (barra verde), Pso-DNL (n=6) (barra verde cuadrícula), Pso-DL (n=6) (barra verde rayada), IS-E (n=6) (barra naranja), Pso-ENL (n=4) (barra naranja cuadrícula) y Pso-EL (n=6) (barra naranja rayada) permitiendo el contacto celular en relación 1:2 (MSCs: CMSP) durante 2 días de cultivo. La expresión de las moléculas en linfocitos T activados en ausencia de MSCs se consideró como el control positivo (n=6) (barra blanca). Media del porcentaje de expresión ± SEM de CD25 (A) en linfocitos T CD3<sup>+</sup>, (B) CD4<sup>+</sup> y (C) CD8<sup>+</sup>; expresión de CD69 (D) en linfocitos T CD3<sup>+</sup>, (E) CD4<sup>+</sup> y (F) CD8<sup>+</sup> y expresión de CTLA-4 (G) en linfocitos T CD3<sup>+</sup>, (H) CD4<sup>+</sup> y (I) CD8<sup>+</sup>.

#### **8.4. Efecto de MSCs derivadas de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis sobre la expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.**

En nuestro laboratorio hemos reportado que la expresión intracelular de CTLA-4, un regulador negativo de la inflamación se incrementa en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados durante 3 días, en una población CD3<sup>+</sup> enriquecida ó 6 días de una población de CMSP, cuando se cultivan en presencia de MSCs derivadas de IS-MO y SCU en contacto celular. Lo anterior sugiere que la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> puede participar como una población reguladora (Castro-Manreza *et al.*, 2014).

Para evaluar la expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se realizaron cocultivos de CMSP activadas y MSCs en contacto celular y se analizó la intensidad media de fluorescencia (“MFI” por sus siglas en inglés *Median Fluorescence Intensity*) de la molécula CTLA-4 en una población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 9). La MFI de la expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en ausencia de MSCs se consideró como control positivo. Observamos que únicamente MSCs derivadas de IS-MO y Pso-ENL son capaces de incrementar significativamente el valor de MFI de CTLA-4 en una población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, (1.76 y 2.01 veces respectivamente  $p < 0.05$ ). Sin embargo, en cocultivos de MSCs provenientes de IS-D, Pso-DL, IS-E y Pso-EL se observó tendencia al incremento en los valores de MFI de CTLA-4, pero sin diferencias significativas (1.57, 1.56, 1.10 y 1.11 veces respectivamente). Por otra parte, las MSCs provenientes de Pso-DNL no incrementaron el valor de MFI de la expresión de CTLA-4 en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (0.82 veces).

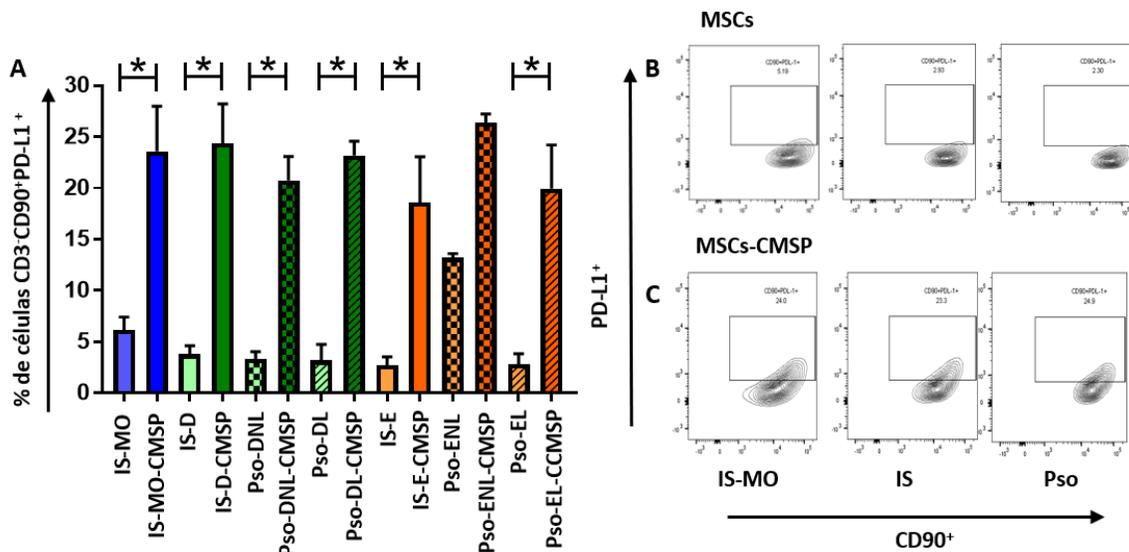


**Figura 9: Expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> en cocultivo con MSCs.** CMSP activadas con PHA se cultivaron en presencia de MSCs de IS-MO (n=5) (barra azul), IS-D (n=6) (barra verde), Pso-DNL (n=6) (barra verde cuadriculada), Pso-DL (n=6) (barra verde rayada), IS-E (n=6) (barra naranja), Pso-ENL (n=4) (barra naranja cuadriculada) y Pso-EL (n=6) (barra naranja rayada) permitiendo el contacto celular, en una relación 1:2 (MSCs: CMSP), durante 6 días de cultivo. La expresión de las moléculas en linfocitos T activados en ausencia de MSCs se consideró como el control (n=5) (barra blanca). Se muestra la media ± SEM del incremento en veces de la MFI de la molécula CTLA-4 en una población de LT CD4<sup>+</sup>. \*Indica diferencia estadísticamente significativa con p<0.05.

### **8.5. La expresión de PD-L1 es incrementada en MSCs provenientes de la piel de pacientes con psoriasis en presencia de linfocitos T activados**

Otro mecanismo por el que las MSCs ejercen sus propiedades inmunoregulatoras es a través de moléculas de membrana. En nuestro grupo de trabajo se ha reportado la importancia del contacto celular para que las MSCs ejerzan sus propiedades inmunoregulatoras (Castro-Manrreza *et al.*, 2014), por tal motivo decidimos evaluar el efecto que tienen los linfocitos T activados sobre la expresión de la molécula PD-L1 en MSCs. Para evaluar su expresión, se realizaron cocultivos con CMSP activadas, permitiendo el contacto celular. La expresión de esta molécula en las MSCs cultivadas en ausencia de linfocitos T, se consideró como la expresión constitutiva de la misma (control). Los resultados muestran que las MSCs provenientes de IS-D, Pso-DNL, Pso-DL, IS-E, Pso-ENL y de Pso-EL presentan un porcentaje bajo de la expresión de PD-L1 de manera constitutiva (3.8%±1.7, 3.3%±1.5, 3.2%±1.5, 2.7%±0.8, 12.8%±0.1 y 2.5%±0.7

respectivamente), al igual que las MSCs derivadas de IS-MO (6.2%±2.5). De manera interesante, la presencia de linfocitos T activados incrementó la presencia de PD-L1 en MSCs derivadas de IS-D (24.4%±3.8 p>0.05), Pso-DNL (20.8%±2.3 p>0.05), Pso-DL (23.2%±1.4 p>0.05), IS- E (18.6%±4.5 p>0.05) y Pso-EL (21.3±5.2 p>0.05), al igual que IS-MO (23.6%±4.4 p>0.05). No se observó diferencia significativa en MSCs provenientes de Pso-ENL (25.7%±0.16), (Figura 10A). Debido a que en los valores de las MSCs evaluadas no se encontró diferencias entre sí, se muestra un representativo de individuos sanos (IS) y de la población de pacientes con psoriasis (Pso) respecto a la expresión de PD-L1 de manera constitutiva (Figura 10B) ó en presencia de CMSP activadas (Figura 10C).

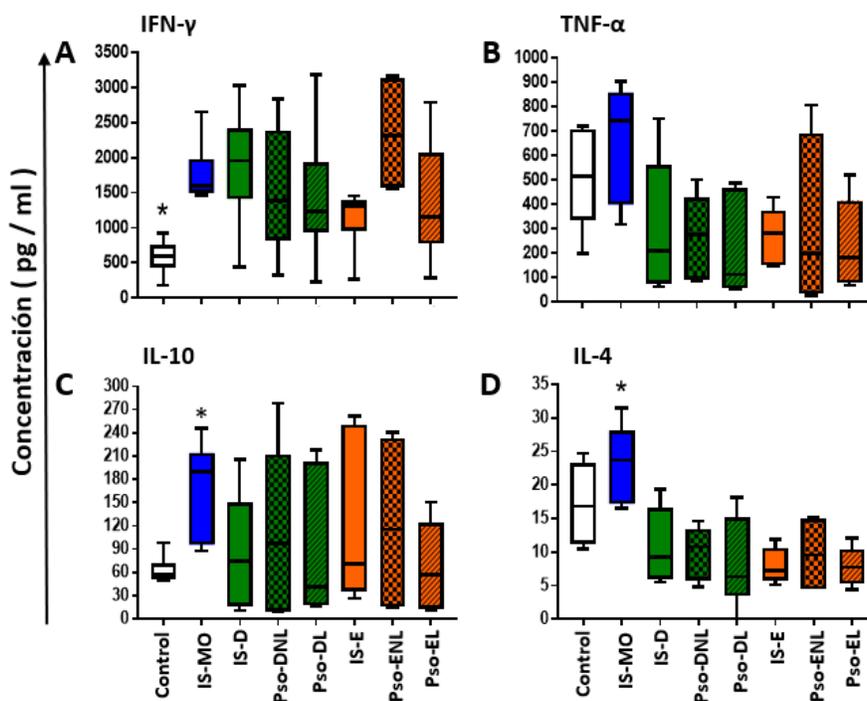


**Figura 10: La expresión de PD-L1 es incrementada en las MSCs derivadas de individuos sanos y de pacientes con psoriasis en presencia de linfocitos T activados.** CMSP activadas con PHA se cultivaron en presencia de MSCs de IS-MO (n=6) (barra azul), IS-D (n=6) (barra verde), Pso-DNL (n=6) (barra verde cuadriculada), Pso-DL (n=6) (barra verde rayada), IS-E (n=6) (barra naranja), Pso-ENL (n=2) (barra naranja cuadriculada) y Pso-EL (n=6) (barra naranja rayada) permitiendo el contacto celular, en una relación 1:2 (MSCs: CMSP), durante 7 días de cultivo. La expresión de PD-L1 en MSCs cultivadas en ausencia de linfocitos T activados se consideró como la expresión constitutiva de la molécula (control). (A) Media±SEM del porcentaje de MSCs CD3<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>. (B) Gráficos de contorno representativos de un experimento de MSCs de IS-MO, de IS y Pso en ausencia de linfocitos T activados. (C) Gráficos de contorno representativos de un experimento de MSCs de IS-MO, IS y de Pso en presencia de linfocitos T activados. \*Indica diferencia estadísticamente significativa con p<0.05.

### **8.6. Evaluación de la producción de citocinas en presencia de MSCs derivadas de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis.**

Debido a que encontramos un incremento en la expresión de PD-L1 en las MSCs derivadas de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis, evaluamos si las moléculas solubles presentes en el medio de cocultivo presentan un perfil inmunoregulatorio. Estudios previos indican la importancia de IFN- $\gamma$  para incrementar la expresión de PD-L1 (Tipnis *et al.*, 2010) en MSCs, otros reportes sugieren la presencia de otras moléculas inflamatorias como TNF- $\alpha$  (Davies *et al.*, 2016). En nuestro laboratorio hemos comprobado que su incremento, se debe a la interacción con linfocitos T activados y a la presencia de moléculas como IFN- $\gamma$ . Además, también se ha detectado como resultado de dicha interacción, un aumento de moléculas inmunoregulatorias tipo Th2 como IL-4 e IL-10 en el cocultivo (Aggarwal y Pittenger 2005; Krampera *et al.*, 2006), por lo tanto, la deficiencia de inhibición de la proliferación sobre linfocitos T, puede estar relacionada con la presencia o ausencia de dichas moléculas. Con base en lo anterior decidimos evaluar la concentración de citocinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10), así como proinflamatorias (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ), en cocultivos. La concentración de citocinas detectadas en el medio de linfocitos T activados en ausencia de MSCs se consideró como el control. En nuestros resultados detectamos un incremento significativo de IFN- $\gamma$  en todas las condiciones en presencia de MSCs con respecto al control (Figura 11A), IS-MO ( $1763.67 \pm 449.8$  pg/mL,  $p > 0.05$ ), IS-D ( $1884.55 \pm 842.9$  pg/mL,  $p > 0.05$ ), Pso-DNL ( $1524.07 \pm 901.3$  pg/mL,  $p > 0.05$ ), Pso-DL ( $1423.63 \pm 964.8$  pg/mL,  $p > 0.05$ ), IS-E ( $1148.02 \pm 441.3$  pg/mL,  $p > 0.05$ ), Pso-ENL ( $2335.00 \pm 886.9$  pg/mL,  $p > 0.05$ ) y Pso-EL ( $1354.80 \pm 860.1$  pg/mL,  $p > 0.05$ ). Otra molécula involucrada en la activación de las MSCs para que ejerzan sus propiedades inmunoregulatorias es TNF- $\alpha$ . En nuestro sistema se observó una tendencia a ser incrementada solo en MSCs derivadas de IS-MO ( $663.78 \pm 236.78$  pg/mL) (Figura 11B) con respecto al control. No se observó este comportamiento en los cultivos con MSCs de IS-D ( $301.63 \pm 270.7$  pg/mL), Pso-DNL ( $273.50 \pm 166.2$  pg/mL), Pso-DL ( $214.54 \pm 204.1$  pg/mL), IS-E ( $275.22 \pm 118.4$  pg/mL), Pso-ENL ( $307.59 \pm 362.8$  pg/mL) ó de Pso-EL ( $235.98 \pm 180.2$  pg/mL). Nuestro grupo de investigación ha reportado aumento en la cantidad de IL-10 en cocultivos con MSCs-IS-MO, molécula clave en la inmunoregulación de las mismas (Castro-Manreza *et al.*, 2014). En este estudio encontramos que el medio condicionado

obtenido de cocultivos con MSCs IS-D ( $85.84 \pm 79.5$  pg/mL), Pso-DNL ( $113.55 \pm 111.5$  pg/mL) , Pso-DL ( $88.37 \pm 93.9$  pg/mL), IS-E ( $118.99 \pm 106.2$  pg/mL), Pso-ENL ( $121.36 \pm 120.5$  pg/mL) ó de Pso-EL ( $67.53 \pm 58.0$  pg/mL), tiene una menor concentración de esta citocina, con respecto al medio condicionado obtenido de IS-MO ( $169.16 \pm 62.7$  pg/mL,  $p > 0.05$ ) (Figura 11C). Finalmente IL-4, una molécula secretada por linfocitos T, se incrementa en presencia de MSCs IS-MO, como lo reportado anteriormente (Castro-Manreza *et al.*, 2014), ya que observamos que en cocultivos de dicha fuente fué aumenta la concentración de esta citocina ( $23.29 \pm 5.7$  pg/mL,  $p > 0.05$ ) (Figura 11D), en comparación con IS-D ( $10.86 \pm 5.7$  pg/mL), Pso-DNL ( $10.03 \pm 3.9$  pg/mL), Pso-DL ( $9.91 \pm 6.0$  pg/mL), IS-E ( $7.95 \pm 2.6$  pg/mL), Pso-ENL ( $14.86 \pm 0.4$  pg/mL) y Pso-EL ( $8.57 \pm 2.5$  pg/mL). Estos resultados sugieren que las MSCs de piel de individuos sanos, así como de pacientes con psoriasis no presentan diferencias entre ellas en el perfil de inmunoregulación por citocinas.



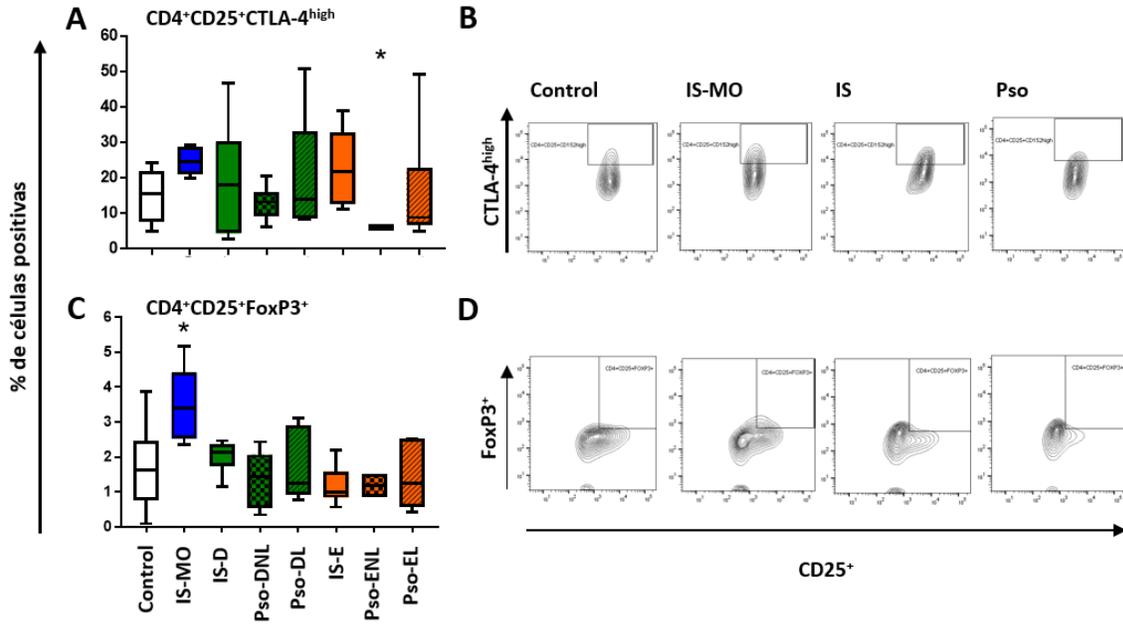
**Figura 11: Evaluación del perfil de concentración de citocinas en cocultivos de MSCs provenientes de piel de individuos sanos y pacientes con psoriasis con linfocitos T.** Linfocitos T CD3<sup>+</sup> activadas con perlas anti-CD3/CD28 se cultivaron en presencia de MSCs de IS-MO (n=5) (barra azul), IS-D (n=6) (barra verde), Pso-DNL (n=6) (barra verde cuadriculada), Pso-DL (n=6) (barra verde rayada), IS-E (n=6) (barra naranja), Pso-ENL (n=4) (barra naranja cuadriculada) y Pso-EL (n=6) (barra naranja rayada) permitiendo el contacto celular, en una relación 1:1 (MSCs: linfocitos T CD3<sup>+</sup>) durante 6 días de cultivo. La concentración de las citocinas en el sobrenadante de linfocitos T activados en ausencia de MSCs se consideró como control positivo (n=6) (barra blanca). (A) Concentración de INF- $\gamma$ , (B) concentración de TNF- $\alpha$ , (C) concentración de IL-10 y (D) concentración de IL-4. \* Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.05$ .

### 8.7. MSCs provenientes de piel de individuos sanos, así como de pacientes con psoriasis presentan disminuida su capacidad de generación de linfocitos Treg

Debido a que las MSCs derivadas de piel de pacientes sanos, así como de pacientes con psoriasis promueven un aumento de CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, una molécula constitutiva en los linfocitos Treg (Valk *et al.*, 2008), pero presentan deficiente perfil de secreción de IL-10 e IL-4, moléculas que participan en la generación de estas células (Selmani *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2014; Miyagawa *et al.*, 2017), evaluamos si esta baja concentración de citocinas, así como el aumento de CTLA-4, afecta la capacidad de las MSCs de generar esta población celular. En nuestro laboratorio, hemos reportado que MSCs provenientes de IS-MO y SCU promueven la generación de linfocitos Treg a partir

de una población CD3<sup>+</sup> enriquecida (Castro-Manreza *et al.*, 2014). Por lo tanto, decidimos analizar el porcentaje de generación de poblaciones con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>high</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Se consideró a la población basal de los linfocitos T activados en ausencia de MSCs como control.

En nuestros resultados no encontramos diferencias significativas en la generación de linfocitos tipo Treg con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>high</sup> en presencia de MSCs provenientes de IS-MO, IS-D, Pso-DNL, Pso-DL, IS-E ó de Pso-EL (24.67%±4.1, 19.14%±16.0, 12.93%±4.7, 20.49%±16.3, 22.90%±11.6 y 15.48%±16.9 respectivamente), aunque en Pso-ENL fue baja su generación comparada con el control (5.99%±0.02, p>0.05) (Figura 12A). En contraste las MSCs provenientes de IS-MO son capaces de generar una población de linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> estadísticamente significativo (3.51%±0.4, p>0.05) a partir de CMSP, en comparación MSCs provenientes de IS-D, Pso-DNL, Pso-DL, IS-E, Pso-ENL ó de Pso-EL (2.03%±0.5, 1.37%±0.8, 1.70%±1.0, 1.18%±0.6, 1.19%±0.4, y 1.42%±0.9 respectivamente) (Figura 12B). Los resultados observados en la capacidad de generación de poblaciones reguladoras, nos indican que las MSCs evaluadas no presentan diferencias significativas entre sí, debido a ello, se muestran gráficos de puntos de solo una representación de IS y de Pso para el potencial de generación de poblaciones de linfocitos Treg con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>high</sup> (Figura 12C) y de linfocitos Treg con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> en presencia de CMSP activadas (Figura 12D).



**Figura 12: Las MSCs provenientes de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis poseen deficiente potencial para generar poblaciones reguladoras de linfocitos T.** CMSP activadas con PHA se cultivaron en presencia de MSCs de IS-MO (n=6) (barra azul), IS-D (n=6) (barra verde), Pso-DNL (n=6) (barra verde cuadrículada), Pso-DL (n=6) (barra verde rayada), IS-E (n=6) (barra naranja), Pso-ENL (n=2) (barra naranja cuadrículada) y Pso-EL (n=6) (barra naranja rayada) permitiendo el contacto celular, en una relación 1:2 (MSCs:CMSP) durante 6 días de cocultivo. Media±SEM del (A) porcentaje de linfocitos T  $CD4^+CD25^+CTLA-4^{high}$ , (B) porcentaje de linfocitos T  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ . Gráficos de contorno representativos de un experimento de MSCs de IS-MO, DS y Pso en presencia de linfocitos T activados (C) para la generación de linfocitos T  $CD4^+CD25^+CTLA-4^{high}$  y (D) linfocitos T  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ . \* Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.05$ .

## **9. DISCUSIÓN**

Las MSCs fueron identificadas por primera vez en IS-MO (Friedenstein *et al.*, 1974), desde entonces son motivo de estudio debido a que esta población celular heterogénea presenta potenciales idóneos que pueden ser aplicables a la terapia celular. La médula ósea ha sido reconocida por ser la principal fuente de MSCs y de la cual se tiene mayor conocimiento sobre sus propiedades. Se ha reportado la presencia de estas células en diferentes fuentes ya sea neonatales o adultos así como, provenientes de tejidos en condiciones sanas o con alteraciones fisiológicas, indicándonos que este tipo de población celular se puede obtener de diversos tejidos, y por eso es necesario evaluar las propiedades fisiológicas de cada una de ellas para establecer las capacidades que pueden tener para su posible uso terapéutico o para conocer su participación dentro de un tejido ya sea en condiciones sanas o alteradas.

En nuestro grupo de trabajo se ha evaluado la presencia de MSCs en diversos tejidos como: PL, SCU (Montesinos *et al.*, 2009), tejidos dentales (Matamoros-de María y Campos, tesis de maestría 2016) así como, parte del microambiente tumoral en cáncer cérvico uterino (Montesinos *et al.*, 2013). Las células antes mencionadas presentaron los criterios establecidos por la ISCT, es decir, morfología fibroblastoide, alta capacidad de proliferación en cultivos *in vitro*, expresión de las moléculas de superficie CD90, CD105 y CD73 característicos de MSC-IS-MO, y ser negativos a marcadores hematopoyéticos CD34, CD45, CD14, HLA-DR y/o endotelial CD31, al igual que una capacidad de diferenciación hacia osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Dominici *et al.*, 2006). Hemos reportado que las MSCs provenientes de fuentes alternativas a la MO, cuentan con propiedades funcionales distintas entre cada una de ellas, que involucran potenciales de diferenciación (Montesinos *et al.*, 2009), inmunoregulación (Castro-Manrreza *et al.*, 2014) así como de soporte hematopoyético (Fajardo-Orduña *et al.*, 2015).

Estudios previos han sugerido la presencia de MSCs en la dermis de diferentes zonas anatómicas de la piel como prepucio (Bartsch *et al.*, 2005; Toma *et al.*, 2005; Najar *et al.*, 2016), folículo capilar (Zhang *et al.*, 2013), punciones de biopsias de la espalda de pacientes con paraplejia (Zong *et al.*, 2012), punciones de biopsia de seno (Niu *et al.*, 2016), biopsias de cuero cabelludo en zonas afectadas por la calvicie (Potdar y Kumar, 2013), así como de zonas no lesionadas de pacientes con vitíligo (Mahabal *et al.*, 2016).

Otros estudios indican que bajo un crecimiento en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos (“FGF” por sus siglas en inglés *Fibroblast Growth Factor*) y factor de crecimiento epidermal (“EGF” por sus siglas en inglés *Epidermal Growth Factor*), se obtienen células con características de MSCs similares a las provenientes de IS-MO con alta capacidad de expansión (Riekstina *et al.*, 2008).

Similar a otros grupos de investigación (Vaculik *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2015; Reinisch *et al.*, 2015), hemos obtenido mediante un sistema de migración celular, células adherentes provenientes de la dermis de piel sana de abdomen y con capacidad proliferativa, potencial de diferenciación adipogénico, osteogénico y condrogénico, y con una alta expresión de marcadores CD90, CD73 y CD105, así como, una baja expresión para CD34, CD45 y HLA-DR. No encontramos diferencias en las características previamente mencionadas de las MSCs de todas las fuentes evaluadas e incluso al compararlas con aquellas provenientes de IS-MO. En nuestros resultados se obtuvieron MSCs en ausencia de factores de crecimiento como FGF y EGF exógenos, similar a otro reporte (Zong *et al.*, 2012), aunque se ha indicado que la caracterización de MSCs provenientes de IS-D no se ve afectada por la presencia de estos factores de crecimiento (Zhang *et al.*, 2013).

Estudios previos han reportado que poblaciones celulares provenientes de IS-D, poseen potencial de diferenciación hacia adipocitos, osteocitos, condrocitos, células de endotelio, melanocitos, células productoras de insulina, pericitos, neuronas, células glía, células de Schwann, hepatocitos y células del musculo liso (Vishnubalaji *et al.*, 2012). Nuestros resultados señalan que las MSCs provenientes de todas las fuentes evaluadas poseen capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica, aunque se observa disminuida en comparación con MSCs de IS-MO, lo cual nos indica una diferencia en esta propiedad. Resultados similares fueron publicados por otro grupo de investigación que indican un perfil diferente de expresión génica entre esta población celular derivada de IS-MO y de IS-D (Al-Nbaheen *et al.*, 2013), posiblemente debido a una diferencia en la regulación epigenética entre cada fuente (Reinisch *et al.*, 2015; Lazzarini *et al.*, 2016).

En relación con el inmunofenotipo, observamos diferentes porcentajes de expresión de CD73 y un alto porcentaje de CD90 entre cada una de las fuentes evaluadas de piel. CD73 es una molécula que ha sido relacionada con una mayor capacidad de diferenciación

adipogénica en poblaciones dermales cultivadas *in vitro*, al igual que CD271. Asimismo se ha publicado que células CD90<sup>+</sup> provenientes de dermis sana, poseen un menor potencial de diferenciación adipogénica (Vaculik *et al.*, 2012). Estos resultados podrían estar relacionados con la capacidad de diferenciación disminuida de las MSCs evaluadas que hemos descrito en este estudio.

La expresión de CD13 fue alta y homogénea en las 6 fuentes de piel evaluadas como previamente reportamos en MSCs derivadas de IS-MO, SCU y PL (Montesinos *et al.*, 2009) y MSCs provenientes de cáncer cervicouterino (Montesinos *et al.*, 2013); por lo tanto se propone como un marcador que define a esta población celular en diversos tejidos.

Nuestros resultados indican que no se presentan diferencias morfológicas, de marcadores de superficie o de capacidad de diferenciación entre las MSCs provenientes de cada una de las fuentes evaluadas. Estos resultados son similares a lo que se han publicado en estudios en donde se comparan las MSCs provenientes de Pso-DNL y de IS-D (Liu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Pokdar y Kumar, indicaron que las MSC-IS-D pueden mantener un fenotipo epitelial con características diferentes a MSCs de otras fuentes y con expresión de queratina 18, en este mismo estudio sugirió que esta diferencia puede ser inducida por las condiciones de cultivo, señalando a la concentración de suero como un factor de este suceso (Potdar y Kumar, 2013).

Se ha establecido que uno de los mecanismos mediante el cual las MSCs ejercen sus propiedades inmunoregulatoras sobre linfocitos T, es mediante la inhibición de la proliferación de una manera proporción dependiente (MSCs: linfocitos T) (Ramamany *et al.*, 2008). En nuestros resultados las MSCs provenientes de piel no disminuyeron la proliferación sobre linfocitos T en un sistema con contacto celular y no mostraron diferencias entre las fuentes evaluadas; estos resultados son opuestos a aquellos reportes que indican una inhibición de MSCs derivadas de IS-D y de Pso-DL sobre linfocitos T a partir de CMSP activadas con anti CD3/CD28 e IL-2 en proporción 10:1 (MSCs:CMSP), en ausencia de contacto celular durante 3 días de cultivo (Liu *et al.*, 2014) o de MSCs derivadas de IS-D sobre una población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en proporción 1:1 (MSCs: linfocitos T) y activadas con anti CD3/CD28 durante 3 días de cultivo (Zhou *et al.*, 2013); esta contradicción probablemente se debe al aumento en el tiempo de cultivo (7 días) o a la

cantidad de células utilizadas, así como el protocolo de cultivo (tipo de linfocitos T y modo de activación).

Se ha reportado que la inhibición de la proliferación sobre linfocitos T por MSCs dependen de la presencia de un ambiente inflamatorio, compuesto por IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17, para que puedan ser “activadas” y ejerzan sus propiedades inmunoregulatoras (Krampera *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2007; Ramasamy *et al.*, 2008; Sivanathan *et al.*, 2015; Davies *et al.*, 2016). Para evaluar este efecto, se han establecido protocolos en donde se activan a las MSCs con IFN- $\gamma$  previo al cocultivo con linfocitos T y se ha observado una mejor respuesta en la función inhibitoria de las MSCs sobre la proliferación de linfocitos T (Kronsteiner *et al.*, 2011). Najar y colaboradores reportan que MSCs derivadas de IS-D preactivadas con IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , ejercen un efecto inhibitorio de la proliferación sobre linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 durante 5 días, de manera proporción (MSCs: linfocitos T) dependiente (Najar *et al.*, 2016). En nuestros resultados obtuvimos que las MSCs derivadas de IS-D, Pso-DNL, Pso-DL, IS-E, Pso-ENL o Pso-EL, no inhiben la proliferación sobre linfocitos T y esto podría ser debido, entre otros aspectos, a las concentraciones disminuidas de activadores de las MSCs; sin embargo la activación exógena de las MSCs previo al cocultivo puede no ser necesaria para ejercer esta propiedad, dado que se ha demostrado que las MSCs derivadas de IS-MO poseen este potencial sobre poblaciones CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> cuando son activados con perlas antiCD3/CD28 (Castro-Manrreza *et al.*, 2014) o con PHA (Hernández-Estévez, tesis de maestría 2016).

No observamos cambios en la expresión de marcadores involucrados en la activación temprana CD25, CD69 y CTLA-4 en los linfocitos T cocultivados en presencia de MSCs. Resultados similares se han demostrado en linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en presencia de MSC-IS-MO (Krampera *et al.*, 2006; Ramasamy *et al.*, 2008). Sin embargo también se ha publicado que la presencia de MSCs disminuye la expresión de estas moléculas utilizando un sistema de CMSP activadas con PHA (Le Blanc *et al.*, 2004; Groh *et al.*, 2005), esta disminución que se acentúa particularmente en la expresión de CD25<sup>+</sup> en presencia de IL-17A (Sivanathan *et al.*, 2015). Asimismo similar a nuestros resultados, se ha observado que la expresión de CD69 no se ve afectada por la presencia de MSC-IS-MO

aún con la presencia de IL-17A (Sivanathan *et al.*, 2015). Estos resultados indican que las MSCs a los 2 días de cocultivo, aún no presentan propiedades inmunosupresoras sobre los linfocitos T, probablemente porque no hay activación efectiva a este tiempo para ejercer dicha propiedad (Krampera *et al.*, 2006).

Otro de los mecanismos de las MSCs para inmunoregular la inflamación, es a través de la molécula de membrana PD-L1 (CD274), la cual, al igual que su isoforma PD-L2, se incrementa en presencia de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y favorece la inhibición de la proliferación sobre linfocitos T (Davies *et al.*, 2016). No obstante, también se ha demostrado, mediante el uso de anticuerpos para bloquear PD-L1, que dicho efecto puede ser independiente de esta molécula, dado que se ha observado el reestablecimiento de la proliferación de linfocitos T mediante su inactivación (Sivanathan *et al.*, 2015). En nuestro estudio encontramos que las MSCs de las diferentes fuentes evaluadas de piel, al igual que las MSC-IS-MO, expresan en la membrana PD-L1 (CD274) de manera constitutiva. Resultados similares se han publicado en MSCs de membrana amniótica, tejido adiposo, cordón umbilical (Tipnis *et al.*, 2010; Kronsteiner *et al.*, 2011) y cérvix (Hernández-Estévez, tesis de maestría 2016). En contraste, otros grupos no han encontrado la expresión de manera constitutiva de PD-L1 en MSCs provenientes de IS-D (Najar *et al.*, 2016); estas diferencias pueden ser explicadas mediante el método de obtención de MSS-IS-D entre los estudios. De manera interesante observamos un incremento significativo de los niveles de expresión de PD-L1 en las MSCs derivadas de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis, ello en presencia de un ambiente inflamatorio establecido por las CMSP activadas con PHA. Resultados similares se han encontrado en MSC-IS-D en presencia de IFN- $\gamma$  (Najar *et al.*, 2016), de cáncer cervicouterino en cultivo con CMSP activadas con PHA (Hernández-Estévez, tesis de maestría 2016), con fuentes neonatales al cultivarse en presencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con perlas antiCD3/CD28 (Castro-Manrreza *et al.*, 2014) y con MSC-IS-MO activadas con IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Davies *et al.*, 2016). El incremento en la expresión de PD-L1 se ha asociado a un aumento en la concentración de IFN- $\gamma$  en el medio de cultivo (Tipnis *et al.*, 2010; Kronsteiner *et al.*, 2011; Najar *et al.*, 2016). Al respecto, también en nuestros cocultivos encontramos un aumento de IFN- $\gamma$  en el medio de todas las fuentes evaluadas, lo cual puede relacionarse con el incremento de PD-L1 observado.

Las MSCs son una población celular que puede regular la inflamación mediante la secreción de moléculas solubles favoreciendo un ambiente inmunosupresor (Castro-Manreza y Montesinos, 2015). En nuestro estudio no encontramos que las células evaluadas presenten diferencias entre IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ . Otros grupos de investigación indican que otras moléculas como óxido nítrico, VEGF, EGF, SCF, IL-11, IL-17A, se encuentran en mayor concentración en presencia de MSC-Pso-DL en comparación con MSC-IS-D (Orciani *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Campanati *et al.*, 2014), al igual que en su regulación genética (Hou *et al.*, 2014). Asimismo no se observó diferencias significativas en las concentraciones de IL-10 y TNF- $\alpha$  entre las fuentes de piel evaluadas, lo cual concuerda con estudios previos que indican que no hay diferencias entre en los niveles de secreción de IL-10 y TNF- $\alpha$  entre MSCs derivadas de IS-D y Pso-DL (Liu *et al.*, 2013).

En nuestros resultados observamos que la concentración de IL-10 en medio con presencia de MSCs de piel no presentaron diferencias con respecto a los linfocitos T cultivados en ausencia de las mismas, por otro lado se observó el incremento de la concentración de esta citocina cuando IS-MO estuvo presente, similar a estudios previos (Prevosto *et al.*, 2007), este incremento de esta citocina también se presenta en cocultivos de MSCs derivados de SCU (Castro-Manreza *et al.*, 2014). Un estudio realizado por Najar y colaboradores indican que las MSC-IS-D activadas con moléculas inflamatorias y en presencia de linfocitos T aumenta la concentración de IL-10 en el medio (Najar *et al.*, 2016), sin embargo aunque observamos un aumento de INF- $\gamma$  en los cocultivos con MSCs de piel, no encontramos aumento de dicha molécula, lo cual concuerda con resultados previos que indican que la presencia en cultivo de INF- $\gamma$  no afecta su concentración en el medio (Ryan *et al.*, 2007).

La IL-4 es una molécula secretada por linfocitos Th2 y esta involucrada en las propiedades inmunoregulatoras de las MSCs (Aggarwal y Pittenger, 2005). Al respecto detectamos una disminución de la concentración de esta molécula en los cocultivos de MSCs provenientes de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis, en comparación con aquellos en presencia de MSC-IS-MO, sin encontrar diferencias entre las fuentes evaluadas. Se ha reportado que las MSCs de IS-D y Pso-DL no presentan diferencias

en la expresión de esta citocina (Campanati *et al.*, 2014), lo cual nos sugiere que la baja concentración de IL-4 pudiera ser una de las respuestas a la disminución de la capacidad inmunosupresora observada en nuestro estudio. De manera similar a lo que observamos con MSC-IS-MO, otros grupos han reportado que la expresión de IL-4, al igual que IL-10, es incrementada en cocultivos con CMSP o linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Kwon *et al.*, 2014; Miyagawa *et al.*, 2017). En nuestro laboratorio también hemos asociado esta disminución en la concentración de IL-4 e IL-10 con una deficiencia inmunoreguladora en MSCs derivadas de cérvix (García-Rocha *et al.*, 2015; Hernández-Estévez, tesis de maestría 2016).

Observamos que en todos nuestros cocultivos se incrementó la concentración de IFN- $\gamma$ , lo cual se contrapone con reportes que señalan que la presencia de MSCs disminuye su concentración en presencia de linfocitos T activados (Aggarwal y Pittenger, 2005; Ramasamy *et al.*, 2008) o que no se modifica en el medio condicionado (Miyagawa *et al.*, 2017). Sin embargo los resultados de este estudio, coinciden con publicaciones previas de nuestro grupo en donde hemos reportado que la presencia de MSC-IS-MO, SCU y PL aumenta la concentración de IFN- $\gamma$  (Castro-Manreza *et al.*, 2014). Campanati y colaboradores reportaron que estas células derivadas de Pso-DL presentan mayor expresión de esta molécula en comparación con IS-D (Campanati *et al.*, 2014). La controversia entre estos estudios puede radicar en la población de linfocitos T utilizados (CMSP o CD3<sup>+</sup>), así como en la fuente de donde provienen las MSCs (Kronsteiner *et al.*, 2011).

No se encontró diferencia en la concentración de TNF- $\alpha$  en nuestro sistema, sin embargo, se observó una tendencia a una mayor concentración en aquellos cocultivos con presencia de MSC-IS-MO en comparación con aquellas derivadas de individuos sanos y pacientes con psoriasis. Estudios previos señalan que no existe disimilitud en la secreción de TNF- $\alpha$  entre MSCs provenientes de IS-Der y aquellas provenientes de piel con dermatitis aguda (Orciani *et al.*, 2017), aunque se ha reportado una disminución de la expresión de esta molécula en dicha población derivada de Pso-DL en comparación de IS-D (Campanati *et al.*, 2014). Se ha indicado la importancia de esta molécula para activar a las MSCs de IS-MO (Davies *et al.*, 2016) y de IS-D (Najar *et al.*, 2016) para ejercer sus propiedades inmunosupresoras.

Estudios previos indican que las MSCs son capaces de generar linfocitos Treg, ya sea a partir de una población CD3<sup>+</sup> enriquecida o de CMSP y ello es dependiente de la proporción celular utilizada (MSCs: linfocitos T) (Prevosto *et al.*, 2007). Nuestros resultados indican el aumento de CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> en nuestras condiciones de cocultivo; esta molécula se encuentra de manera constitutiva en linfocitos Treg y tiene un papel inhibitorio de la activación al ser un receptor competitivo de CD28, una molécula coestimuladora de la activación de los linfocitos T al unirse con CD80 y CD86 (Valk *et al.*, 2008). Similares a nuestros resultados, pero en una población CD3<sup>+</sup> enriquecida y en diferente tiempo de cultivo, esta molécula se incrementa en la fracción CD4<sup>+</sup> en presencia de MSCs derivadas de IS-MO, SCU y PL (Castro-Manreza *et al.*, 2014). Sin embargo, este aumento encontrado de CTLA-4 parece no estar relacionado con la generación de una población reguladora funcional, ya que no se encontró un incremento de la generación de linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>high</sup> en presencia de las fuentes de piel evaluadas, así como de IS-MO, lo cual se contrapone a resultados previos realizados en una población enriquecida de linfocitos T CD3<sup>+</sup> (Castro-Manreza *et al.*, 2014).

Otros estudios indican que linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de otras células inmunológicas cultivadas en presencia de MSC-IS-MO no expresan CTLA-4 (Prevosto *et al.*, 2007). Por otro lado se ha encontrado que CTLA-4 se incrementa en una población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en presencia de IS-MO y se describe que las poblaciones CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> coexpresan CTLA-4, lo cual se asocia a una propiedad inmunosupresora (Maccario *et al.*, 2005). Similar a otro grupo de investigación reportamos la presencia de una población tipo reguladora CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> (Sivanathan *et al.*, 2015), aunque al parecer esta población no es suficiente para ejercer un ambiente anti-inflamatorio (Laranjeira *et al.*, 2015), ello posiblemente debido a la concentración disminuida de moléculas solubles anti-inflamatorias, ya que se ha reportado que sus propiedades reguladoras se favorecen por el incremento de IL-4 e IL-10 en el medio de cocultivo con MSC-IS-MO (Miyagawa *et al.*, 2017). Nuestros resultados sugieren que la presencia de otras células inmunológicas como monocitos, células dendríticas y linfocitos B, así como la concentración de IL-4 e IL-10 pueden modificar la capacidad de generación de linfocitos tipo regulador CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>high</sup> por las MSCs, sin ser afectadas por la presencia de IFN- $\gamma$  (Kronsteiner *et al.*, 2011).

Previamente se ha descrito que las MSCs son capaces de generar poblaciones de linfocitos Treg en las fracciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de linfocitos T, estimulados con PHA o perlas anti-CD3, demostrando que la expresión de Foxp3 se presenta únicamente en la primera (Prevosto *et al.*, 2007). Encontramos un incremento de este factor de transcripción en linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de MSC-IS-MO, lo cual es similar a lo anteriormente reportado (Prevosto *et al.*, 2007). Así, detectamos que la generación de linfocitos Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> a partir de una población de CMSP, solamente se presenta en presencia de MSC-IS-MO, siendo comparable a los resultados donde se utilizó una población enriquecida de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (English *et al.*, 2009). Similar a nuestras observaciones se ha indicado que las MSCs derivadas de IS-MO favorecen la generación de linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>Foxp3<sup>+</sup> sobre una población CD3<sup>+</sup> activadas con PHA en contacto celular, incrementando esta generación por la presencia de IFN- $\gamma$  o IL-17A (moléculas inflamatorias) y mostrando que el aumento en la concentración de TGF- $\beta$ , PGE2 e IDO, se asocia a la generación de esta población celular. De igual modo se ha mostrado que la concentración de IDO es tiempo dependiente y es favorecida por la presencia de IFN- $\gamma$  (Sivanathan *et al.*, 2015), lo cual se asocia con resultados en donde el incremento del porcentaje de la generación de linfocitos Treg se aumenta con la duración del cocultivo (Miyagawa *et al.*, 2017).

Asimismo encontramos que la concentración de IL-10 tiende a incrementarse en el medio de los cocultivos de MSCs derivadas de IS-MO, aunque se ha sugerido que esta citocina no es la única involucrada en el proceso de inmunoregulación (Prevosto *et al.*, 2007). También se ha reportado que su aumento, inhibe la polarización de linfocitos T hacia un fenotipo Th1 y favorece una respuesta Th2 (Ghannam *et al.*, 2010). IL-4 es otra molécula asociada a la generación de linfocitos Treg y al respecto observamos que esta molécula solo es incrementada en presencia de MSC-IS-MO similar a resultados anteriores (Kwon *et al.*, 2014; Laranjeira *et al.*, 2015; Miyagawa *et al.*, 2017).

Así, en este estudio reportamos por primera vez que MSCs derivadas de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis no presenta potencial de generación de linfocitos Treg. Pfisterer y colaboradores indican que células dermales adherentes a plástico CD90<sup>+</sup> provenientes de IS-D, son capaces de generar un incremento en la expresión de

Foxp3 sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> enriquecidos y estimulados con anti-CD3/CD28, en comparación con su fracción negativa, sin observar diferencias en células que presentan o no CD73 (Pfisterer *et al.*, 2015).

Se han involucrado a las moléculas IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> (Prevosto *et al.*, 2007; English *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2014; Laranjeira *et al.*, 2015; Miyagawa *et al.*, 2017), IDO (Sivanathan *et al.*, 2015) y HLA-G5 (Selmani *et al.*, 2008) en la generación de linfocitos Treg en presencia de MSCs. En nuestros resultados no se observó la generación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en los sistemas de cocultivo, estos datos coinciden con la capacidad de secreción de moléculas solubles reportadas anteriormente, las cuales no muestran diferencias de IL-4 y TGF- $\beta$  entre IS-D y Pso-DL (Campanati *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014) y así como la nula expresión de HLA-G en presencia de un ambiente inflamatorio (Najar *et al.*, 2016). Estudios comparativos en donde se evalúa su efecto en presencia de un ambiente inflamatorio con ausencia de linfocitos T, se ha reportado que las MSCs derivadas de IS-D tienen un mayor nivel de expresión de IDO, galanina y semaforina 4A en comparación con IS-MO (Fayyad-kazan *et al.*, 2017), estas últimas 2 aún no se conoce su relación con el efecto inmunosupresor. Por lo tanto, sugerimos que las inadecuada concentración de moléculas solubles presentes en el medio de cultivo se relacionan con el déficit de generación de linfocitos Treg por las MSCs derivadas de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis.

En nuestros resultados encontramos que existe una variación en la expresión de CD73 en las MSCs de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis, esta molécula se asocia junto con CD39 a la participación de la vía adenosinérgica como otro mecanismo involucrado en la inmunoregulación de las mismas (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011). Se ha reportado la ausencia de la expresión de CD39 en MSCs derivadas de IS-D de manera constitutiva y se mantiene este comportamiento frente a un ambiente inflamatorio (Najar *et al.*, 2016), contrario a aquellas células derivadas de IS-MO que aumentan su expresión en un ambiente inflamatorio (Kerkelä *et al.*, 2016). Otros autores han demostrado que las MSCs derivadas de IS-D presentan una tasa baja de degradación de ATP e incluso se incrementa su concentración, debido probablemente a la liberación de esta molécula intracelular por las mismas, lo cual implica que este aumento podría apoyar a la respuesta

inflamatoria de las MSCs de piel (Naasani *et al.*, 2017). El proceso de generación de adenosina (molécula anti-inflamatoria) es un proceso cooperativo entre MSCs y linfocitos Treg (Kerkelä *et al.*, 2016). En nuestros resultados indicamos la incapacidad de generación de poblaciones reguladoras de las MSCs de piel de donador sano y de pacientes con psoriasis, por lo tanto sugerimos, similar a otros autores (Najar *et al.*, 2016), que la generación disminuida de la adenosina por parte de las MSCs derivadas de IS-D, puede afectar sus propiedades inmunoreguladoras.

Estudios previos indican que las MSCs derivadas de IS-D y Pso-DL aumentan la proliferación y apoptosis de queratinocitos en un modelo *in vitro* (Liu *et al.*, 2015). Además estas células pueden interactuar con el endotelio mediante mecanismos parácrinos aumentando la concentración de VEGF (Salvolini *et al.*, 2010). También se ha reportado un incremento de la expresión de esta molécula en MSCs provenientes de Pso-DL y la disminución en la expresión de genes inhibidores de la angiogénesis IGFBP5 y GATA6 (Hou *et al.*, 2014), lo cual está relacionado con el incremento de la angiogénesis en la psoriasis (Simonetti *et al.*, 2006). El estudio de la participación de estos mecanismos en las MSCs de las fuentes estudiadas está en proceso.

De acuerdo a nuestros resultados podemos decir que las MSCs de piel no tienen capacidad inmunoreguladora y una de las razones podría ser el estado de polarización proinflamatorio, que depende de la expresión de receptores tipo Toll (“TLR” por sus siglas en inglés *Toll Like Receptor*) (Waterman *et al.*, 2010). Se ha reportado la expresión de TLR-4 en MSCs derivadas de IS-D de manera constitutiva, polarizándolas hacia un comportamiento inflamatorio (Najar *et al.*, 2016). Las MSCs son capaces de censar el microambiente y adoptar un fenotipo de acuerdo a las señales recibidas, adoptando tanto una polarización pro o anti-inflamatoria, por lo tanto ejercen diferencias en sus propiedades inmunoreguladoras (Liotta *et al.*, 2008; Bernardo y Fibbe, 2013). En nuestro trabajo es necesario realizar estudios con mayor profundidad al respecto.

Se ha demostrado que MSCs derivadas de fuentes alternas a IS-MO, son capaces de ejercer potenciales inmunoreguladores específicos y diferentes entre ellas (Kronsteiner *et al.*, 2011; Castro-Manreza *et al.*, 2014). En este estudio encontramos que la presencia de INF- $\gamma$  no fue suficiente para que las MSCs de piel ejerzan un papel inmunosupresor

contrario a lo que se ha reportado previamente (Tipnis *et al.*, 2010). Sin embargo, encontramos la tendencia a la disminución de la concentración de TNF- $\alpha$  lo cual resulta interesante debido a que esta molécula activa a las MSCs para inmunosuprimir (Cuerquis *et al.*, 2014), capacidad que encontramos carente en las MSCs de piel.

## **10. CONCLUSIONES**

- Detectamos la presencia de MSCs en IS-E, Pso-ENL, Pso-EL, IS-D, Pso-DNL y Pso-DL, dado a que presentaron morfología fibroblastoide, capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica, así como de los marcadores de inmunofenotipo que caracterizan a estas células. Las MSCs de piel detectadas, no muestran diferencias respecto a dichas características entre cada una de las fuentes evaluadas.
- Las MSCs de piel no presentan capacidad inhibidora de la proliferación de linfocitos T.
- Las MSCs de piel no afectan la expresión de moléculas de iniciación de la activación CD25, CD69 y CTLA-4 en linfocitos T.
- Las MSCs de piel presentan de manera constitutiva la expresión de la molécula PD-L1, la cual se incrementa en presencia de linfocitos T activados. El incremento en la expresión de PD-L1, no es suficiente para favorecer la inhibición de la proliferación de linfocitos T.
- Se evidenció que la falta de capacidad inmunosupresora de linfocitos T por parte de las MSCs de piel, parece estar relacionada con una disminución de la concentración de citocinas inmunosupresoras como IL-4 e IL-10 en el sistema de cocultivo evaluado, las cuales podrían ser producidas de manera ineficiente por las MSCs y linfocitos T.
- La concentración disminuida de TNF- $\alpha$  en nuestro sistema de cocultivo en presencia de MSCs de piel, pudiera dar por resultado la inadecuada activación de las mismas y por consiguiente disminuir su capacidad inmunosupresora.
- Las MSCs de piel poseen una deficiente capacidad de generar linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, en comparación con MSCs derivadas de IS-MO.

## **11. PERSPECTIVAS**

Debido a que encontramos MSCs en piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis, considero interesante estudiar si a nivel transcritómico y preteómico presentan diferencias entre cada una de las fuentes evaluadas y con ello poder encontrar una caracterización más profunda.

Las MSCs derivadas de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis no presentarán inhibición de la proliferación sobre linfocitos T, así como como generación de linfocitos T reguladores, estudios previos indican la participación de citocinas proinflamatorias para su activación y con ello puedan ejercer sus propiedades inmunoregulatorias. Sería interesante determinar si la exposición de moléculas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 exógeno modula el comportamiento de las MSCs de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis sobre la proliferación de linfocitos T y generación de linfocitos T reguladores.

En nuestro trabajo encontramos que en el sistema de cocultivo de MSCs de piel de individuos sanos y de donadores con psoriasis con linfocitos T se ve aumentada la concentración de INF- $\gamma$  por lo tanto se podría evaluar con el uso de anticuerpos si se ven afectadas otras moléculas relacionadas con la inmunoregulación de las MSCs como IDO, prostaglandina, HLA-G5, TGF- $\beta$ . También sería interesante analizar si dichas células pueden inmunoregular otros componentes celulares del sistema inmunológico como células dendríticas ó células NK.

Con nuestro trabajo establecimos que las MSCs derivadas de IS-MO y de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis presentan diferencias en sus propiedades inmunoregulatorias. Nuestros datos contribuyen al conocimiento biológico de la población celular de las fuentes evaluadas, esto es importante debido a que el uso de MSCs de piel de IS en protocolos de investigación se ha aumentado en los últimos años. Determinar diferencias en sus propiedades funcionales, puede favorecer una mejor desición para su uso.

## **12. LITERATURA CITADA**

- Aggarwal S y Pittenger MF. “Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses.” *Transplantation* 105.4 (2005): 1815–1822.
- Al-Nbaheen M et al. “Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential.” *Stem Cell Reviews and Reports* 9.1 (2013): 32–43.
- Asociación Mexicana contra la Psoriasis, A.C. “Psoriasis.” *Psoriasis*. N.p., 2014.
- Bai J et al. “Epigenetic Downregulation of SFRP4 Contributes to Epidermal Hyperplasia in Psoriasis.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194.9 (2015): 4185–98.
- Bangert C et al. “Immune Functions of the Skin.” *Clinics in Dermatology* 29.4 (2011): 360–376.
- Bartsch G et al. “Propagation, Expansion, and Multilineage Differentiation of Human Somatic Stem Cells from Dermal Progenitors.” *Stem Cells and Development* 14.3 (2005): 337–348.
- Bernardo ME y Fibbe WE. “Review Mesenchymal Stromal Cells : Sensors and Switchers of Inflammation.” *Cell Stem Cell* 13.4 (2013): 392–402.
- Bos JD et al. “The Skin Immune System (SIS): Distribution and Immunophenotype of Lymphocyte Subpopulations in Normal Human Skin.” *Journal of Investigative Dermatology* 88.5 (1987): 569–573.
- Campanati A et al. “Characterization and Profiling of Immunomodulatory Genes in Resident Mesenchymal Stem Cells Reflect the Th1-Th17/Th2 Imbalance of Psoriasis.” *Archives of Dermatological Research* 306.10 (2014): 915–920.
- Castro-Manreza ME et al. “Células Troncales Mesenquimales.” *Células Troncales Biología Y Aplicaciones En Biomedicina*. Ed. Ma Antonieta Chávez-González et al. First Edit. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2017. 239–63.

- Castro-Manrreza ME et al. “Human Mesenchymal Stromal Cells from Adult and Neonatal Sources: A Comparative in Vitro Analysis of Their Immunosuppressive Properties against T Cells.” *Stem cells and development* 23.11 (2014): 1217–32.
- Castro-Manrreza ME y Montesinos JJ. “Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells : Biological Aspects and Clinical Applications.” *Journal of Immunology Research* 2015.394917 (2015): n. pag.
- Clark RA. “Skin Resident T Cells: The Ups and Downs of on Site Immunity.” *Journal of Investigative Dermatology* 130.2 (2010): 362–370.
- Clark RA et al. “The Vast Majority of CLA<sup>+</sup> T Cells Are Resident in Normal Skin.” *The Journal of Immunology* *The Journal of Immunology* 176.7 (2006): 4431–4439.
- Cuerquis J et al. “Human Mesenchymal Stromal Cells Transiently Increase Cytokine Production by Activated T Cells before Suppressing T-Cell Proliferation: Effect of Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Stimulation.” *Cytotherapy* 16.2 (2014): 191–202.
- Davies LC et al. “Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression.” *Stem Cells* 35.3 (2016): 766–776.
- Di Meglio P et al. “The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function.” *Immunity* 35.6 (2011): 857–869.
- Di Nicola M et al. “Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli.” *Blood* 99.10 (2002): 3838–3843.
- Dominici M et al. “Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement.” *Cytotherapy* 8.4 (2006): 315–7.
- English et al. “Cell Contact , Prostaglandin E<sub>2</sub> and Transforming Growth Factor Beta 1 Play Non-Redundant Roles in Human Mesenchymal Stem Cell Induction of CD4<sup>+</sup>

- CD25<sup>High</sup> Forkhead Box P3<sup>+</sup> Regulatory T Cells.” *Clinical and Experimental Immunology* 156.1 (2009): 149–160.
- Fajardo-Orduña GR et al. “Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential.” *Archives of Medical Research* 46.8 (2015): 589–596.
- Fayyad-kazan H y Lagneaux L. “Identification and Evaluation of New Immunoregulatory Genes in Mesenchymal Stromal Cells of Different Origins : Comparison of Normal and Inflammatory Conditions.” *Medical Science Monitor Basic Research* 23 (2017): 87–96.
- Forni MF et al. “Stem Cells in Embryonic Skin Development.” *Biological Research* 45.3 (2012): 215–222.
- Friedenstein AJ et al. “Stromal Cells Responsible for Transferring the Microenvironment of the Hemopoietic Tissues. Cloning in Vitro and Retransplantation in Vivo.” *Transplantation* 17.4 (1974): 331–40.
- Fuchs E. “Epidermal Differentiation: The Bare Essentials.” *The Journal of Cell Biology* 111.6 (1990): 2807–2814.
- García-Rocha R et al. "Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer tumors induce TGF-β1 expression and IL-10 expression and secretion in the cervical cancer cells, resulting in protection from cytotoxic T cell activity." *Cytokine*. (2015): 1-9.
- Ghannam S et al. “Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype.” *The Journal of Immunology* 185.1 (2010): 302–312.
- Groh ME et al. “Human Mesenchymal Stem Cells Require Monocyte-Mediated Activation to Suppress Alloreactive T Cells.” *Experimental Hematology* 33.8 (2005): 928–934.
- Hernández-Cristino JM. "Estudio in vitro de la Morfología, Inmunofenotipo y Capacidad de Diferenciación de las Células Troncales Mesenquimales provenientes de pacientes con Psoriasis." Tesis de Pregrado. Universidad Nacional Autónoma de México.

(2016).

Hernández-Estévez EH. "Evaluación de la Capacidad Inmunosupresora de Células Troncales Mesenquimales provenientes de Cáncer de Cérvix." Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. (2016).

Hou R et al. "Gene Expression Profile of Dermal Mesenchymal Stem Cells from Patients with Psoriasis." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 28.12 (2014): 1782–1791.

Huang B et al. "Generation of Human Epidermis-Derived Mesenchymal Stem Cell-like Pluripotent Cells (hEMSCPCs)." *Scientific Reports* 3.1 (2013): 1933.

Jiang S et al. "Biomarkers of An Autoimmune Skin Disease-Psoriasis." *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 13.4 (2015): 224–233.

Jiang XX et al. "Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Differentiation and Function of Monocyte-Derived Dendritic Cells." *Blood* 105.10 (2005): 4120–4126.

Kerkelä E et al. "Adenosinergic Immunosuppression by Human Mesenchymal Stromal Cells Requires Co-Operation with T Cells." *Stem Cells* 34.3 (2016): 781–90.

Klimczak A y Kozłowska U. "Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis." *Stem Cells International* 2016.4285215 (2016): n. pag.

Kouros AS et al. "Psoriasis as the Marker of Underlying Systemic Disease." *Skin therapy letter* 13.1 (2008): 1–5.

Krampera M et al. "Role for Interferon- $\gamma$  in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." *Stem Cells* 24.2 (2006): 386–398.

Kronsteiner B et al. "Human Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Amnion Influence T-Cells Depending on Stimulation Method and Presence of Other Immune Cells." *Stem Cells and Development* 20.12 (2011): 2115–2126.

- Kwon MS et al. “The Immunomodulatory Effects of Human Mesenchymal Stem Cells on Peripheral Blood Mononuclear Cells in ALS Patients.” *Journal of neurochemistry* 131.2 (2014): 206–18.
- Lande R et al. “Plasmacytoid Dendritic Cells Sense Self-DNA Coupled with Antimicrobial Peptide.” *Nature* 449.7162 (2007): 564–9.
- Laranjeira P et al. “Effect of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells on Cytokine Production by Peripheral Blood Naive , Memory , and Effector T Cells.” *Stem cell Research and Therapy* 6.3 (2015): 1–14.
- Lazzarini R et al. “New miRNAs Network in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Skin and Amniotic Fluid.” *International journal of immunopathology and pharmacology* 29.3 (2016): 523–8.
- Le Blanc K et al. “Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Expression of CD25 (Interleukin-2 Receptor) and CD38 on Phytohaemagglutinin-Activated Lymphocytes.” *Scandinavian Journal of Immunology* 60.3 (2004): 307–315.
- Li H et al. “Interferon-  $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  Promote the Ability of Human Placenta E Derived Mesenchymal Stromal Cells to Express Programmed.” *Cytotherapy* 17.11 (2015): 1560–1571.
- Liotta F et al. “Toll-Like Receptors 3 and 4 Are Expressed by Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Can Inhibit Their T-Cell Modulatory Activity by Impairing Notch Signaling.” *Stem Cells* 26.1 (2008): 279–89.
- Liu RF et al. “Mesenchymal Stem Cells from Skin Lesions of Psoriasis Patients Promote Proliferation and Inhibit Apoptosis of HaCaT Cells.” *Genetics and Molecular Research* 14.4 (2015): 17758–17767.
- Liu R et al. “Lymphocyte Inhibition Is Compromised in Mesenchymal Stem Cells from Psoriatic Skin.” *European Journal of Dermatology* 24.5 (2014): 560–567.
- Liu Y et al. “Abnormalities in Cytokine Secretion from Mesenchymal Stem Cells in

- Psoriatic Skin Lesions.” *Eur J Dermatol* 23.235 (2013): 600–7.
- Lowes MA et al. “Psoriasis Vulgaris Lesions Contain Discrete Populations of Th1 and Th17 T Cells.” *The Journal of Investigative Dermatology* 128.5 (2008): 1207–1211.
- Lowes M et al. “Pathogenesis and Therapy of Psoriasis.” *Nature* 445.7130 (2007): 866–873.
- Maccario R et al. “Interaction of Human Mesenchymal Stem Cells with Cells Involved in Alloantigen-Specific Immune Response Favors the Differentiation of CD4<sup>+</sup> T-Cell Subsets Expressing a Regulatory/suppressive Phenotype Rita.” *Haematologica* 90.4 (2005): 516–525.
- Mahabal S et al. “Sequential Cultivation of Human Epidermal Keratinocytes and Dermal Mesenchymal like Stromal Cells in Vitro.” *Cytotechnology* 68.4 (2016): 1009–1018.
- Matamoros-deMaría y Campos DR. "Evaluación de la Capacidad de Soporte Hematopoyético de Células Troncales Mesenquimales provenientes de Tejidos Dentales" Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. (2016).
- Matejuk A. “Skin Immunity.” *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (2017): n. pag.
- McDonald I et al. “A Review of Psoriasis, a Known Risk Factor for Cardiovascular Disease and Its Impact on Folate and Homocysteine Metabolism.” *Journal of Nutrition and Metabolism* 2012 (2012): 965385.
- Meisel R et al. “Human Bone Marrow Stromal Cells Inhibit allogeneic T-Cell Responses by Indoleamine 2,3-Dioxygenase-mediated Tryptophan Degradation.” *Blood* 103.12 (2004): 4619–21.
- Menter A y Stoff B. *Psoriasis*. Ed. Jill Northcott. Fisrt. Atlanta, Georgia: N.p., 2011.
- Miyagawa I et al. “Induction of Regulatory T Cells and Its Regulation with Insulin-like Growth Factor/Insulin-like Growth Factor Binding Protein-4 by Human Mesenchymal

Stem Cells.” *The Journal of Immunology* 199.5 (2017): 1616–1625.

Montesinos JJ et al. “Human Mesenchymal Stromal Cells from Adult and Neonatal Sources: Comparative Analysis of Their Morphology, Immunophenotype, Differentiation Patterns and Neural Protein Expression.” *Cytotherapy* 11.2 (2009): 163–176.

Montesinos JJ et al. “In Vitro Evidence of the Presence of Mesenchymal Stromal Cells in Cervical Cancer and Their Role in Protecting Cancer Cells from Cytotoxic T Cell Activity.” *Stem cells and development* 22.18 (2013): 2508–19.

Mora-García ML et al. “Mesenchymal Stromal Cells Derived from Cervical Cancer Produce High Amounts of Adenosine to Suppress Cytotoxic T Lymphocyte Functions.” *Journal of Translational Medicine* 14.1 (2016): 302.

Naasani LIS et al. “Extracellular Nucleotide Hydrolysis in Dermal and Limbal Mesenchymal Stem Cells: A Source of Adenosine Production.” *Journal of Cellular Biochemistry* 118.8 (2017): 2430–2442.

Najar M et al. “Mesenchymal Stromal Cells from the Foreskin: Tissue Isolation, Cell Characterization and Immunobiological Properties.” *Cytotherapy* 18.3 (2016): 320–335.

Najar M y Lagneaux L. “Foreskin as a Source of Immunotherapeutic Mesenchymal Stromal Cells.” *Immunotherapy* 9.2 (2017): 207–217.

Nihal M et al. “Detection of Clonally Restricted Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangements in Normal and Lesional Skin.” *The Journal of Molecular Diagnostics* 2.1 (2000): 5–10.

Niu X et al. “Expression of pro-Angiogenic Genes in Mesenchymal Stem Cells Derived from Dermis of Patients with Psoriasis.” *International Journal of Dermatology* 55.5 (2016): e280–e288.

Orciani M et al. “Th 1 -Th 17 and Th 2 Imbalance in Mesenchymal Stem Cells of Adult

- Patients with Atopic Dermatitis: At the Origin of the Problem.” *The British journal of dermatology* 176.6 (2017): 1569–1576.
- Orciani M et al. “The Mesenchymal Stem Cell Profile in Psoriasis.” *British Journal of Dermatology* 165.3 (2011): 585–592.
- Park JR et al. “Isolation of Human Dermis Derived Mesenchymal Stem Cells Using Explants Culture Method: Expansion and Phenotypical Characterization.” *Cell and Tissue Banking* 16.2 (2015): 209–218.
- Pasić A et al. “The Genetics of Psoriasis--Selected Novelties in 2008.” *Acta dermatovenerologica Croatica : ADC* 17.3 (2009): 176–81.
- Pasparakis M et al. “Mechanisms Regulating Skin Immunity and Inflammation.” *Nature Reviews Immunology* 14.5 (2014): 289–301.
- Pfisterer K et al. “CD90(+) Human Dermal Stromal Cells Are Potent Inducers of Foxp3(+) Regulatory T Cells.” *The Journal of investigative dermatology* 135.1 (2015): 130–41.
- Potdar P y Kumar K. “Establishment and Molecular Characterization of Human Dermal Mesenchymal-like Stem Cells Derived from Human from Human Scalp Biopsy of Androgenetic Alopec.” *Stem Cell Discovery* 3.2 (2013): 77–82.
- Prevosto C et al. “Generation of CD4+ or CD8+ Regulatory T Cells upon Mesenchymal Stem Cell-Lymphocyte Interaction.” *Haematologica* 92.7 (2007): 881–888.
- Ramasamy R et al. “The Immunosuppressive Effects of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Target T Cell Proliferation but Not Its Effector Function.” *Cellular Immunology* 251.2 (2008): 131–136.
- Rasmusson I et al. “Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Formation of Cytotoxic T Lymphocytes, but Not Activated Cytotoxic T Lymphocytes or Natural Killer Cells.” *Transplantation* 76.8 (2003): 1208–1213.
- Reinisch A et al. “Epigenetic and in Vivo Comparison of Diverse MSC Sources Reveals an

- Endochondral Signature for Human Hematopoietic Niche Formation.” *Blood* 125.2 (2015): 249–260.
- Richmond JM y Harris JE. “Immunology and Skin in Health and Disease.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4.12 (2014): 1–20.
- Riekstina U et al. “Characterization of Human Skin-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation Rate in Different Growth Conditions.” *Cytotechnology* 58.3 (2008): 153–162.
- Ryan JM et al. “Interferon- $\gamma$  Does Not Break, but Promotes the Immunosuppressive Capacity of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.” *Clinical and Experimental Immunology* 149.2 (2007): 353–363.
- Saldanha-Araujo F et al. “Mesenchymal Stromal Cells up-Regulate CD39 and Increase Adenosine Production to Suppress Activated T-Lymphocytes.” *Stem Cell Research* 7.1 (2011): 66–74
- Salvolini E et al. “Skin-Derived Mesenchymal Stem Cells (S-MSCs) Induce Endothelial Cell Activation by Paracrine Mechanisms.” *Experimental Dermatology* 19.9 (2010): 848–850.
- Sano S et al. “Stat3 Links Activated Keratinocytes and Immunocytes Required for Development of Psoriasis in a Novel Transgenic Mouse Model.” *Nature Medicine* 11.1 (2005): 43–49.
- Selmani Z et al. “Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells.” *Stem Cells* 26.1 (2008): 212–222.
- Short B et al. “Mesenchymal Stem Cells.” *Arch.Med Res.* 34.0188–4409 (Print) LA–eng PT–Journal Article PT–Review SB–IM (2003): 565–571.
- Simonetti O et al. “VEGF Is Likely a Key Factor in the Link between Inflammation and

- Angiogenesis in Psoriasis: Results of an Immunohistochemical Study.” *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 19.4 (2006): 751–760.
- Sivanathan KN et al. “Interleukin-17A-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Are Superior Modulators of Immunological Function.” *Stem Cells* 33 (2015): 2850–2863.
- Spaggiari GM et al. “Mesenchymal Stem Cell – Natural Killer Cell Interactions: Evidence That Activated NK Cells Are Capable of Killing MSCs, Whereas MSCs Can Inhibit IL-2 – Induced NK-Cell Proliferation.” *Blood* 107.4 (2006): 1484–1490.
- Tipnis S et al. “Immunosuppressive Properties of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells: Role of B7-H1 and IDO.” *Immunology and cell biology* 88.8 (2010): 795–806.
- Toma JG et al. “Isolation and Characterization of Multipotent Skin-Derived Precursors from Human Skin.” *Stem Cells* 23.6 (2005): 727–37.
- Vaculik C et al. “Human Dermis Harbors Distinct Mesenchymal Stromal Cell Subsets.” *Journal of Investigative Dermatology* 132.3 (2012): 563–574.
- Valk E et al. “CTLA-4 Trafficking and Surface Expression.” *Trends in Immunology* 29.6 (2008): 272–279.
- Villaseñor-Park J et al. “Psoriasis: Evolving Treatment for a Complex Disease.” *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 79.6 (2012): 413–423.
- Vishnubalaji R et al. “Skin-Derived Multipotent Stromal Cells – an Archival for Mesenchymal Stem Cells.” *Cell and tissue research* 350.1 (2012): 1–12.
- Visscher M y Narendran V. “The Ontogeny of Skin.” *Advances in Wound Care* 3.4 (2014): 291–303.
- Waterman RS et al. “A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype.” *PLoS ONE* 5.4 (2010): e10088.

- Yan S et al. "NF- $\kappa$ B-Induced microRNA-31 Promotes Epidermal Hyperplasia by Repressing Protein Phosphatase 6 in Psoriasis." *Nature communications* 6.May (2015): 7652.
- Yazdi A et al. "Cutaneous Immunology: Basics and New Concepts." *Seminars in Immunopathology* 38.1 (2016): 3–10.
- Zhang M et al. "Differentiation of Human Epidermis-Derived Mesenchymal Stem Cell-like Pluripotent Cells into Neural-like Cells in Culture and after Transplantation." *Stem Cell Discovery* 2.4 (2012): 141–154.
- Zhang X et al. "Maintenance of High Proliferation and Multipotent Potential of Human Hair Follicle-Derived Mesenchymal Stem Cells by Growth Factors." *International Journal of Molecular Medicine* 31.4 (2013): 913–921.
- Zhou Met al. "Dermal Mesenchymal Stem Cells (DMSCs) Inhibit Skin-Homing CD8<sup>+</sup> T Cell Activity, a Determining Factor of Vitiligo Patients' Autologous Melanocytes Transplantation Efficiency." *PLoS ONE* 8.4 (2013): e60254.
- Zong Z et al. "Isolation and Characterization of Two Kinds of Stem Cells from the Same Human Skin Back Sample with Therapeutic Potential in Spinal Cord Injury." *PLoS ONE* 7.11 (2012): e50222.