



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**SECRETARÍA DE SALUD DE LA CIUDAD DE MÉXICO  
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN**

**CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN  
DERMATOLOGÍA**

**“IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LINFOCITOS TH17  
PATOGÉNICOS EN PIEL AFECTADA DE PACIENTES DE 18 A 80 AÑOS,  
CON PSORIASIS ACTIVA, DEL CENTRO DERMATOLÓGICO DR.  
LADISLAO DE LA PASCUA”**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

**PRESENTADO POR: ELIZABETH GONZÁLEZ PALACIOS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN  
DERMATOLOGÍA**

**DIRECTORES DE TESIS:  
DR. FERMÍN JURADO SANTA CRUZ  
QFB. GIBRAN PÉREZ MONTESINOS  
DRA. MARÍA LUISA PERALTA PEDRERO**

**CIUDAD DE MÉXICO**

**-2019-**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

“IPATOGÉNICOS EN PIEL AFECTADA DE PACIENTES DE 18 a 80 AÑOS,

“IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LINFOCITOS TH17  
PATOGÉNICOS EN PIEL AFECTADA DE PACIENTES DE 18 a 80 AÑOS, CON  
PSORIASIS ACTIVA, DEL CENTRO DERMATOLÓGICO DR. LADISLAO DE LA  
PASCUA”

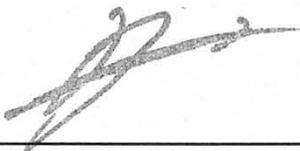
AUTOR: ELIZABETH GONZALEZ PALACIOS

Vo.Bo.  
Dr. Fermín Jurado Santa Cruz



Profesor Titular del Curso de Especialización en Dermatología

Vo. Bo.  
Dr. Federico Miguel Lazcano Ramírez

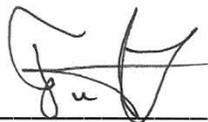


Director de Educación e Investigación



SECRETARIA DE SALUD  
SEDESA  
CIUDAD DE MÉXICO  
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN  
E INVESTIGACIÓN

DIRECTORES DE TESIS:



---

Dr. Fermín Jurado Santa Cruz  
Profesor Titular de la especialidad de Dermatología Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua"



---

QFB. Gibrán Pérez Montesinos  
Responsable del servicio de Inmunodermatología Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua"



---

Dra. María Luisa Peralta Pedrero  
Profesora adjunta y Coordinadora de Investigación del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua"

INDICE	
RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
RESULTADOS.....	68
DISCUSIÓN .....	84
CONCLUSIONES .....	85
BIBLIOGRAFIA .....	87

## **RESUMEN**

**Objetivo General:** Actualmente se reporta una incidencia de Psoriasis en México del 2% y su fisiopatología no se encuentra completamente establecida, se ha relacionado con factores proinflamatorios y mayor actividad de linfocitos T principalmente TH17 en la producción de lesiones. Actualmente existe una subpoblación de linfocitos TH17 considerados más patogénicos que el resto, esto solo ha sido demostrado en modelos murinos y en pacientes con Artritis reumatoide, el propósito de este estudio es identificar dicha población en piel con lesiones de psoriasis.

**Material y Métodos:** Se tomaron biopsias de pacientes con psoriasis en placas de la consulta del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua en dichas biopsias se separó la epidermis de la dermis y las suspensiones celulares obtenidas después del cultivo se trataron para teñir los factores de transcripción y/o citocinas intracelulares para identificar a las poblaciones TH17 convencionales y patogénicas con los anticuerpos anti- Ror $\gamma$ t, anti- Runx-1 y anti- T-bet, además de anti-IL-17A, anti-IFN- $\gamma$ .

**Resultados:** Se obtuvieron datos estadísticamente significativos al realizar la comparación Inter grupos de las células activadas con SEB vs las no activadas, sin embargo, al realizar el análisis individualmente no se obtuvo diferencia significativa.

**Conclusiones:** Al comparar a los distintos grupos si se observa una diferencia significativa entre las células no activadas vs las células activadas, tanto en la

proporción de linfocitos TH17 productores de IL-17 como en los productores de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, tenemos un reducido número de pacientes estudiados y esto limita de forma importante el poder estadístico de las pruebas realizadas.

Palabras Clave: Psoriasis, linfocitos TH17.

## **INTRODUCCIÓN**

### **SEDE**

Laboratorio de Inmunodermatología, Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua” y Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, CMN Siglo XXI, IMSS.

### **HISTORIA**

Se consideran que las primeras descripciones que se realizaron de la psoriasis fueron en la época de Hipócrates (460-377 BC) ya que él realizó diversas descripciones de enfermedades dermatológicas, sin embargo, englobaba a todas enfermedades eritemato-escamosas como una sola patología. Existen otros autores que consideran que la psoriasis se confundía con la lepra e incluso en algún tiempo se pensaba que era una variante de esta última.(1,2)

Durante el 129-99 BC la palabra “psoria” que significa condición descamativa, fue primeramente usada por Galeno, para describir una enfermedad caracterizada por costras en los párpados, cantos y escroto; esta condición era pruriginosa y las excoriaciones estaban presentes, aunque fue llamada psoriasis esta afección

probablemente se trataba de un tipo de eczema. Fue hasta el siglo XIX; cuando se le consideró una entidad diferente a la lepra.(2)

Fue hasta 1841 cuando Hebra definitivamente separó estas 2 entidades, en 1879 Heinrich Koebner fue el primero en describir lesiones iguales a la lepra en piel sana que había sufrido algún traumatismo, a mediados del siglo XIX fue cuando se inicia con tratamientos, principalmente basadas en el empirismo y es hasta la segunda mitad del siglo XX cuando se abandonan la mayoría de estos tratamientos dejando solo radiación con rayos UV y el ácido salicílico. (2)

## EPIDEMIOLOGÍA

En la literatura general se reporta una incidencia que va desde el 1.1% de la población mundial hasta el 4%(1,3,4). En México representa 2% de la consulta dermatológica, con una incidencia aproximada de 2.5 millones de personas afectadas, de las cuales, 25-30% cursa con un cuadro clínico de moderado a severo(5). No se existe predominio de sexos, hay dos picos de edad en la presentación, el primero de los 20-30 años y el segundo de los 50 -60 años; en aproximadamente el 75 % de los casos de presenta antes de los 45 años(2,4). En un 5 a 10 % se presenta en niños(2,5).

## CUADRO CLINICO

La psoriasis es una enfermedad autoinmunitaria, crónica, inflamatoria y sistémica de etiología genética, que afecta principalmente la piel y las articulaciones, y puede ser modificada por factores inmunitarios, ambientales, psicosomáticos y bacterianos(1,5).

La psoriasis se caracteriza por placas de diferentes formas y tamaños que pueden ir desde puntiformes hasta grandes placas que pueden cubrir todo el cuerpo; se caracteriza por placas rojas, escamosas en la superficie e infiltradas. Debajo de la escama la piel tiene un eritema homogéneo y puntos hemorrágicos aparecen cuando la escama es removida (signo de Auspitz); tiene predilección por ciertas áreas como codos, rodillas y piel cabelluda, tiende a la simetría y este hallazgo nos puede orientar hacia el diagnóstico.(1,4)

El fenómeno de Koebner generalmente se presenta en los brotes de la enfermedad y es todo o nada; es decir si se presenta una vez en piel traumatizada siempre se presentará en piel con raumas, este fenómeno aparece generalmente de 7 a 14 días posterior al trauma y se presenta en aproximadamente el 25 % de los pacientes. (4)

Existen múltiples variantes de la psoriasis:

- Psoriasis Guttata: se caracteriza por erupciones pequeñas que pueden ir de 0.5 a 1 cm de diámetro, con predilección por tronco y extremidades, se asocia con infecciones estreptocócicas de garganta y es más frecuente en niños.
- Psoriasis de pequeñas placas: se puede parecer a la forma guttata sin embargo se distingue de ésta, en que, predominantemente la edad de presentación es en pacientes adultos; las lesiones son mayores, aproximadamente de 1 a 2 cm de diámetro, y son más infiltradas y escamosas que la guttata.
- Psoriasis Inversa: Se localiza en grandes pliegues como los axilares, genito-crurales y cuello; la escama es mínima o puede no presentarse, además tienden presentar un eritema bien demarcado.
- Psoriasis Eritrodermica: representa la forma generalizada de la enfermedad que afecta todo el cuerpo, el eritema es la característica más prominente, la escama es blanquecina y superficial. Los pacientes suelen perder mucho calor secundario a la vasodilatación tan importante que presentan y puede ocasionar hipotermia.

Existen dos formas de presentación de la psoriasis eritrodérmica; en la primera, las placas crónicas tienden a empeorar involucrando la mayor parte de la superficie corporal y los pacientes responden parcialmente al tratamiento. En la segunda forma, la eritrodermia se presenta súbita e inesperadamente o como resultado de un tratamiento externo no tolerado.

- Psoriasis Papulopustular: que puede ser localizada a o generalizada.
- Sebo psoriasis, se presenta como placas eritematosas con escama oleosa localizada en áreas seboreicas (piel cabelluda, glabella, pliegues nasogenianos, perioral, tórax, áreas interdigitales), es relativamente resistente al tratamiento.
- Psoriasis “napkin”: comienza entre los 3 y 6 meses de edad, aparece en las áreas de pañal como un área roja confluyente, unos días después de pequeñas pápulas rojas en el tronco y puede afectar extremidades también; tiende a desaparecer después del primer año de vida.
- Psoriasis Linear: forma muy rara, se presenta como una lesión linear generalmente en las extremidades puede estar limitada por un dermatoma en el tronco.(4,6)

Las uñas se afectan con frecuencia en la Psoriasis, generalmente entre el 30 al 50% de los individuos, con mayor involucro en las uñas de las manos que las de los pies.(7) Las alteraciones ungueales más frecuentes y significativas son:

- a. Pits ungueales a modo de depresiones puntiformes.
- b. Leuconiquia y pérdida de transparencia de las uñas.
- c. Onicodistrofia severa.

La piel cabelluda se afecta hasta un 70-80 % de los pacientes con psoriasis y en esta localización la enfermedad tiene características peculiares, que la diferencian de la localizada en otras zonas corporales y que comparten un mayor desafío terapéutico. Cerca de la mitad de los pacientes con psoriasis en piel cabelluda aparece como placas eritematosas con escama gruesa o fina de coloración plateada, con síntomas descamativos y de prurito intenso lo que implica que tenga un impacto negativo sobre la calidad de vida dada la persistencia y visibilidad de las lesiones. El cabello dificulta la accesibilidad de los tratamientos tópicos, muchos de estos tienen poca aceptación por parte de los pacientes debido a sus características poco cosméticas.(3)

## HISTOPATOLOGIA

Los cambios histológicos observados en la piel lesionada incluyen una epidermis engrosada por la rápida proliferación de queratinocitos y su diferenciación aberrante, una muy disminuida o ausente capa granular, una marcada dilatación de los vasos en la dermis papilar y gruesas capas de células inflamatorias compuestas de células T células dendríticas en la dermis y células T CD8<sup>+</sup> y neutrófilos en la epidermis.(8)

## ETIOPATOGENIA

La psoriasis puede ser disparada por muchos factores incluyendo lesiones y traumas, infecciones, medicamentos y como respuesta a la aplicación tópica de imiquimod.

Se ha confirmado en diversos estudios que los factores proinflamatorios demostraron tener un gran involucro en la patogénesis de la psoriasis; en placas de psoriasis se han visto mayor actividad de Células T, células dendríticas tipo mieloides y neutrófilos principalmente.(6,9)

Las lesiones de Psoriasis contienen células T que producen IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22, producidas por células Th1, TH17 y Th22 respectivamente. También hay células

CD8<sup>+</sup> que producen el mismo rango de citocinas las cuales se han denominado Tc1, Tc17, Tc22 respectivamente.(6)

Las interacciones de citocinas en psoriasis se han ilustrado como "vía tipo-1", lo que supone una relación lineal entre inductores proximales (IL-23 o IL-12), la producción de IFN- $\gamma$  y TNF por células Th1, y la activación de numerosos genes de IFN- $\gamma$  a través del transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT-1). Aunque este modelo es conceptualmente útil, representa sólo una pequeña fracción de los más de 1.300 genes que se activan positivamente en las lesiones psoriásicas. Existe una explicación alternativa a la respuesta inflamatoria en la psoriasis, donde se propone que los factores de transcripción STAT-1, STAT-3 y el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) se activan. Se ha propuesto que IFN puede ser la señal de activación STAT-1, y el TNF o la IL-1 la de activación de NF- $\kappa$ B; además, recientemente se han descubierto citocinas tales como IL-20 y IL-22 que también tienen la capacidad de activar las vías STAT y NF- $\kappa$ B. Lo anterior que apoya el concepto de que en esta patología existe un entrelazamiento de señales que la manifiestan.(1,10)

Se ha estudiado que las células dendríticas tipo mielóide producen también IL-12 e IL-23 que actúan en el mantenimiento de la activación y diferenciación de los subtipos de linfocitos T.

Los queratinocitos responden a diferentes citocinas promoviendo RNA mensajeros para producir una gama de productos inflamatorios. En términos generales, los productos de queratinocitos tienen la capacidad de inducir regeneración en las células inmunes en la piel para que la activación de células T persista. Las citocinas producidas por los queratinocitos se proponen importantes para la continua migración de los subtipos de leucocitos que tienen una vida media corta; por ejemplo, los neutrófilos y células dendríticas, dándole a la piel una forma de tejido linfoide terciario parecido al que se encuentra en el intestino.(1)

Se ha confirmado que el TNF actúa en los queratinocitos regulando la expresión de genes para la respuesta inmune e inflamatoria, el remodelado celular, ciclo celular y apoptosis. Se ha demostrado que la IL-22 promueve parcialmente la inmunidad innata mediante la regulación de genes en los queratinocitos(11).

Muchas citocinas incluyendo IL-1, IL-6, IL-17, IL-19, IL-20, IL-22, TNF e IFN  $\gamma$ , también pueden regular la proliferación de queratinocitos.(1)

El queratinocito es el principal tipo celular que expresa receptores para IL-17; sin embargo, la IL-17 regula únicamente 35-40 genes en los queratinocitos humanos.(6,12)

Hablando específicamente de la IL-17 y las células T cooperadoras (células TH17) están a menudo presentes en los sitios de inflamación de los tejidos en las enfermedades autoinmunes, lo que ha llevado a la conclusión de que las células TH17 son la principal causa de lesión del tejido. Sin embargo, no todas las células TH17 son patogénicas; de hecho, las células TH17 producen el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), IL-6 e IL-17 pero no inducen fácilmente enfermedad autoinmune sin la exposición a IL-23. Se encontró en un estudio que la producción del TGF- $\beta 3$  por las células TH17 era dependiente de la IL-23 y la IL-6 y que, además, correspondía a células patógenas. Además, las células TH17 inducidas por TGF- $\beta 3$  eran funcionalmente, y molecularmente, distintas de las células TH17 inducidas por TGF- $\beta 1$  y tenían una firma molecular que define células efectoras TH17 patogénicas en otras enfermedades autoinmunes.(13)

Existen varios subtipos de IL-17 que van de la IL-17A a la F, de todas, la IL-17A es la más abundante. Se ha demostrado que los anticuerpos que van contra la IL-17A tienen el potencial para tratar enfermedades autoinmunes en humanos.(14)

No todos los linfocitos TH17 son patogénicos, las células TH17 que se inducen con el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) e IL-6 producen IL-17, pero no inducen autoinmunidad sin la exposición a la IL-23. Se ha encontrado que las TH17 inducidas por TGF- $\beta 3$  son funcional y molecularmente distintas a las inducidas por TGF- $\beta 1$  y tienen una firma molecular que las define como células TH17 patogénicas. La exposición a IL-23 disminuye la concentración de la citocina antiinflamatoria IL-10 en el desarrollo de células TH17, lo que hace que estas células sean patógenas.(13,15)

Esto se demostró usando modelos murinos donde se induce encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE por sus siglas en inglés ) que es el equivalente a un modelo animal de la esclerosis múltiple en humanos. En este modelo se transfirió de forma adoptiva las células T CD4<sup>+</sup> de ratones de la cepa 2D2, que tienen expresión transgénica de un receptor de antígeno de células T específico para los aminoácidos 35-55 de la glicoproteína de oligodendrocito mielina (MOG); y se encontró que sólo la transferencia de células T diferenciadas con TGF- $\beta 1$ ,

IL-6 e IL-23 dio lugar a la inducción de enfermedad grave, mientras que la transferencia de células T diferenciadas con TGF- $\beta$ 1 e IL-6 dio lugar al desarrollo de un cuadro leve o de no enfermedad, y la mayoría de los ratones receptores se recuperaron rápidamente dentro de los 20 días al inicio de la enfermedad clínica. Se realizó además un análisis cuantitativo por medio de RT-PCR que confirmó la inducción de TGF- $\beta$ 3 en células TH17. (13)

En este mismo estudio de modelos murinos se estableció que las células TH17 inducidas por TGF- $\beta$ 3 e IL-6 tenían una expresión reducida de genes que codificaban para moléculas asociadas con inmunorregulación (módulo regulador), incluyendo IL 10, y genes que codificaban moléculas implicadas en la regulación de la producción de IL-10 (Ahr y Maf), así como Il9, Il1rn e Ikzf3 (que codifica el factor de transcripción Aiolos), mientras que las células TH17 inducidas por TGF- $\beta$ 1 e IL-6 tenían expresión regulada de esos genes. (13,15)

Recientemente, Ghoreschi Et al. desafiaron el concepto del TGF- $\beta$  como un componente para el desarrollo de TH17 patógenos , y propusieron que las células TH17 se pueden generar independientemente de TGF- $\beta$ . (15)

Es difícil probar que las células TH17 pueden ser generadas *in vivo* en la ausencia completa de TGF- $\beta$ , ya que TGF- $\beta$ , así como su receptor son

omnipresentes: las células T activadas y especialmente las células TH17 mismas son una fuente importante de TGF- $\beta$ . Además, hay tres formas de TGF- $\beta$  que se activan a través del mismo receptor, y sería necesario bloquear efectivamente las tres formas de TGF- $\beta$  antes de llegar a la conclusión de que las células TH17 se pueden generar en ausencia completa de señalización por TGF- $\beta$ .(15)

Además de todas las interleucinas mencionadas previamente, existe otro factor que convierte a los TH17 en patogénicos, este es el factor de crecimiento estimulante de colonias mieloides y granulocíticas (GM-CSF). El GMCSF no es producido exclusivamente por células TH17, sino también por otros subconjuntos de células T que incluyen células TH1. GM-CSF no sólo induce a células presentadoras de antígeno profesionales para producir citocinas pro-inflamatorias Incluyendo IL-6 e IL-23, por lo tanto, promoviendo la maduración / supervivencia y generación de novo de células TH17; sino que también atrae una ola de células secundarias infiltrantes principalmente macrófagos, que luego amplifican la inflamación. (15)

Las células TH17 que producen IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, se han sugerido que tienen un papel crítico en conducir la inflamación tisular en la autoinmunidad. Las células TH17 están presentes en los sitios de inflamación tisular y están asociadas con la inducción de muchas enfermedades autoinmunes como:

enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, diabetes tipo 1 y esclerosis múltiple. (13)

En Artritis reumatoide (AR) existe un desbalance entre las células TH17 y T reguladoras (Treg), por lo que está postulado que restaurando ese balance se podría tener una droga con muchas oportunidades terapéuticas. Estudios demuestran que la IL-17 aumenta la producción de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en las células presentadoras de antígeno en las articulaciones artríticas; además de que el líquido sinovial de pacientes con AR presenta altos niveles de IL-17. (14)

En pacientes con enfermedad de Behcet se ha demostrado que los TH17 tienen un rol importante en la presentación de uveítis. Similarmente, en pacientes con LES fue evaluado la presencia de CCR4 y CCR6 que están asociados con la producción de CD4 que producen TH17, se encontró una elevada producción de IL-22 e IL-17 comparada con los controles y se ha visto en esta misma enfermedad una relación entre la expresión de TH17 y la actividad de la enfermedad. Otras patologías donde se ha comprobado esto último es en el asma alérgico, donde se correlaciona positivamente con el remodelado de la vía aérea, y la enfermedad de Sjögren. (14)

En múltiples tipos de cáncer incluyendo ovario, hepatocelular, cabeza y células escamosas del cuello, gástrico, color rectal, mama, páncreas y melanoma se encuentran altas cantidades linfocitos TH17 entre el infiltrado linfocitario comparado contra o el tejido adyacente tumoral; lo que sugiere que las células TH17 son reclutadas, inducidas o expandidas en el microambiente tumoral. (14)

## COMORBILIDADES Y PSORIASIS

Existen numerosas enfermedades que han sido relacionadas con la psoriasis, entre ellas se encuentran la obesidad, diabetes mellitus, entre otras; ya sea como un factor de agravamiento o desencadenante de la psoriasis, todas relacionadas con un aumento de las citocinas proinflamatorias.

Se ha estudiado la relación entre la elevación de la proteína C reactiva (PCR) y el desarrollo de síndrome metabólico (SM). Los resultados de un estudio en el que siguieron por 12 semanas a 34 pacientes con psoriasis vulgar y 37 controles sugieren que los factores que pueden inducir inflamación, con el consecuente aumento de las proteínas sensibles a la inflamación, puede ser un precedente en la aparición de diabetes y enfermedad cardiovascular, sobre todo en los

pacientes con obesidad. En dicho estudio concluyen que los pacientes con psoriasis están en mayor riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares; esto podría estar ligado a los efectos producidos por los cambios inflamatorios crónicos como la secreción de citocinas proinflamatorias, sobre todo TNF- $\alpha$ . (5)(16)

Sin embargo, la psoriasis y la obesidad son ambos trastornos inflamatorios que comparten cambios fisiopatológicos incluyendo vías inflamatorias y niveles elevados de citocinas. La obesidad se considera actualmente como una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado caracterizada por una elevación de niveles plasmáticos de citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF e IL-6, y de proteínas de fase aguda tales como la proteína C reactiva (CRP).(17)

En un análisis comparativo de 40,000 pacientes hospitalizados con psoriasis versus enfermos con algún otro padecimiento dermatológico, se encontró en los primeros mayor frecuencia a lo esperado en: obesidad (2.05,  $p < 0.05$ ), hipertensión (1.90,  $p < 0.01$ ), insuficiencia cardíaca (1.83,  $p < 0.001$ ) y diabetes mellitus (1.47,  $p < 0.05$ ). Un análisis adicional de 753 pacientes confirmó la

presencia de comorbilidades en pacientes con psoriasis; en 551 (73%) se diagnosticó dislipidemia, diabetes mellitus e hipertensión arterial sistémica. (5,16)

El alcoholismo y la cirrosis hepática son más frecuentes en estos pacientes. La prevalencia de alcoholismo en los enfermos con psoriasis es de 18%, comparada con 2% en controles. El tabaquismo se ha relacionado especialmente con la variedad pustulosa. (16)

Neimann y asociados han confirmado esta última asociación; al parecer la nicotina altera la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. La nicotina puede modular la capacidad funcional de las células dendríticas y aumentar la secreción de citocinas proinflamatorias que aparecen en la psoriasis, y que además tienen un perfil de lípidos pro-aterogénico que incluye hipertrigliceridemia, concentraciones elevadas de colesterol de baja densidad (LDLc) y lipoproteína (L-a), así como niveles disminuidos de colesterol de alta densidad (HDLc) y apolipoproteína B (Apo B). La dislipidemia es más acentuada en pacientes con psoriasis severa en comparación con sujetos control. (16)

## SUPERNATÍGENOS Y PSORIASIS

Los superantígenos estreptocócicos y estafilocócicos (SAGs) son una familia única de toxinas bacterianas que activan grandes poblaciones de células T CD4

y CD8 y también pueden inducir la activación policlonal de células B. A diferencia de los antígenos peptídicos nominales, los superantígenos se unen al receptor de células T (TCR) fuera del surco de unión del péptido del TCR, junto con la molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de la célula presentadora de antígeno (APC). (18)

Se ha comprobado que el tratamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con enterotoxina B estafilocócica (SEB), la toxina-1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1) y exotoxinas pirógenas estreptocócicas A (SPEA) y C (SPEC) regulan significativamente al alza la expresión cutánea del antígeno linfocitario cutáneo (CLA). El superantígeno conduce a la activación policlonal de células T y liberación de citocinas. (18,19)

Diversos estudios han demostrado una mayor representación de ciertas células T que expresan  $V\beta$  en la psoriasis en placa crónica en comparación con las células T sanguíneas del mismo paciente y un mayor número de células T  $V\beta 2^+$  entre los linfocitos  $CLA^+$  periféricos de pacientes con psoriasis en comparación con sujetos normales. (18)

Wrone-Smith y Nickoloff confirmaron la importancia de la activación de células T estimulando PBMC autólogas de pacientes con psoriasis con IL-2 y SEB. La

inyección intradérmica de estas PBMC estimuladas en la piel clínicamente no involucrada, proveniente de pacientes psoriásicos, injertada en ratones inmunodeficientes (ratones SCID) resultó en el desarrollo de placas con descamación de la piel y características histológicas que recuerdan a la psoriasis. Luego se demostró mediante tinción con inmunoperoxidasa que la epidermis y la dermis del injerto de piel se enriquecieron para las células T CD4 y CD8. (18)

Con estos datos podemos decir que los superantígenos están implicados en el desarrollo y mantenimiento de algunas enfermedades de la piel, ya que también se ha demostrado la activación de estas células en la dermatitis atópica y en la enfermedad de Kawasaki. (18–20)

## ESCALAS DE MEDICIÓN DE LA GRAVEDAD DE LA PSORIASIS

Existen múltiples escalas que se encargan de evaluar la gravedad de esta enfermedad. Sin embargo, la mayoría son médico dependiente, es decir muy subjetivas o no cuentan con estudios que respalden su validez. Por mencionar algunas, tenemos el Body Surface Área (BSA) donde se utiliza la palma de la

mano del paciente como instrumento de medición para calcular el porcentaje de superficie corporal afectada; el Physician's Global Assessment (PGA) y su variante modificada que evalúan la intensidad de la enfermedad pero no la superficie total afectada; el que actualmente está más validado y es usado en todo el mundo es el Índice de Severidad del Área de la Psoriasis (PASI). (21,22)

## PASI

Fue definido por Fredriksson y Pettersson en 1978 para evaluar el efecto del tratamiento con retinoides en psoriasis crónica en placas. (21,22)

Este índice combina la valoración de cada lesión de psoriasis del 0 al 4 (0=ninguno, 1=leve, 2=moderado, 3=marcado, 4=muy marcado) en base a tres parámetros: eritema, infiltración y descamación, así como una evaluación ponderada del área afectada, dividiendo el cuerpo en partes, es decir, cabeza, tronco, extremidades superiores y extremidades inferiores. (21)

Al porcentaje de compromiso de las cuatro regiones anatómicas se le asigna un valor numérico de 0-6; con 0 se indica que no hay compromiso, 1 = 1-9%, 2 = 10-

29%, 3 = 30-49%, 4 =50-69%, 5 = 70-89% y 6 = 90-100% de implicación de BSA.

(22)

Una valoración de intensidad del PASI es considerar leve a los pacientes entre 0-5; moderada de 5-10 y grave en los PASI mayores de 10. Otra clasificación aceptada los divide en leve 0-7; moderada 7-12 y grave en PASI superiores a 12.

(21)

Los problemas de este instrumento es que solo se puede usar en pacientes de psoriasis en placa, sigue siendo subjetivo y no incluye la gravedad de los síntomas.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen actualmente diversos estudios que indican que los linfocitos TH17 juegan un papel importante en la patogénesis de la psoriasis, sin embargo, en la mayoría de estos no se especifican las características ni variables de este tipo de linfocitos, ni en qué porcentaje se encuentran en la piel de pacientes con psoriasis. Conocer esto último sería de vital importancia si consideramos que los diferentes tipos de TH17 responden a diferentes estímulos, liberando diferentes

tipos de interleucinas y por consiguiente pueden inducir diversas características clínicas en los pacientes y probablemente respuestas variables al tratamiento.

(14)

En múltiples estudios se ha demostrado que la IL-17, y los TH17 se encuentran aumentados en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, así como en ratones donde se ha inducido lupus eritematoso sistémico, y en secreciones bronquiales de pacientes con asma (14); tomando en cuenta que son los TH17 patogénicos los que liberan este tipo de citocinas podríamos deducir que en los pacientes con psoriasis se encontrará este tipo de linfocitos aumentados así como las citocinas proinflamatorias correspondientes.

Esto último se puede ser apoyado en la publicación realizado por Diani Et al, donde se identifica un mayor aumento de T cooperadoras en este caso TH17 en pacientes con un PASI elevado además de un PCR elevada a comparación con los controles (23).

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Se encontrará en la piel enferma de pacientes de 18 a 80 años con psoriasis en placas, linfocitos TH17 patogénicos activos y sus interleucinas?

## JUSTIFICACIÓN

La psoriasis es una de las causas más frecuentes de consulta en la práctica dermatológica, llegando a afectar hasta el 5% de la población según algunos reportes y teniendo en cuenta que los pacientes con psoriasis presentan otras comorbilidades como hipertensión, diabetes y otras enfermedades autoinmunes; el conocimiento de la patogenia específica y de cuáles son las citocinas que condicionan las características clínicas de la enfermedad podría ser determinante en el tipo de terapéutica a utilizar, así como en definir el curso que podría seguir la enfermedad en determinados pacientes.

Los resultados que se obtengan de este proyecto podrían tener repercusiones importantes acerca del tratamiento y la evolución a corto y largo plazo de los pacientes con psoriasis, en el Centro Dermatológico Pascua se podrían adecuar a los recursos que se tienen para atender con mayor enfoque a este tipo de pacientes.

## HIPÓTESIS

H1: Existirá un predominio en el número o proporción de linfocitos TH17 con características patogénicas y sus interleucinas proinflamatorias en piel afectada de los pacientes con psoriasis en placas activa.

H0: Existirán linfocitos TH17 no patogénicos en la piel afectada de pacientes con psoriasis en placas activa.

## **OBJETIVOS**

### **GENERALES:**

Identificar y cuantificar la presencia de linfocitos TH17 patogénicos, además del tipo de citocinas predominantes en piel enferma de pacientes con psoriasis en placas.

### **ESPECÍFICOS:**

1. Determinar el índice de actividad y severidad de psoriasis (PASI) en pacientes incluidos en el protocolo.
2. Determinar y cuantificar la presencia de linfocitos TH17 patogénicos en dermis lesionada en pacientes con psoriasis en placa.

4. Correlacionar la presencia de linfocitos TH17 patogénicos en dermis lesionada de pacientes con psoriasis en placa con el subtipo de esta.
5. Identificar cuáles son las citocinas predominantes en dermis lesionada de pacientes con psoriasis en placa.
6. Correlacionar la presencia de interleucinas proinflamatorias en dermis lesionada de pacientes con psoriasis en placa con el PASI que presentan.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio trasversal, descriptivo comparativo.

### DESCRIPCION DE VARIABLES

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Unidad de medición	Escala de medición
Sexo	Identificación de género	Se registra en base al sexo de asignación social	Independiente	Hombre- Mujer	Dicotómica
Edad	Años cumplidos al momento del estudio	Edad en años al momento del estudio según algún registro oficial	Independiente	Valor numérico	De razón
PASI	Índice de severidad del área de psoriasis	Se registra en puntos según la extensión y las características clínicas de la enfermedad	Independiente	Valor numérico	Nominal

Tiempo de evolución	Número de meses que el paciente refiere haber padecido la enfermedad	Número de meses que ha presentado lesiones clínicas de psoriasis	Independiente	Valor numérico	Ordinal
Porcentaje de Linfocitos TH17 convencionales	Linfocitos que no son capaces de activar respuesta inflamatoria	Se obtiene a partir de los datos de citometría de flujo	Dependiente	Valor numérico	Nominal
Porcentaje de Linfocitos TH17 Patogénicos	Linfocitos que son capaces de activar respuesta inflamatoria	Se obtiene a partir de los datos de citometría de flujo.	Dependiente	Valor numérico	Nominal
Porcentaje de IL 17, IL 22, IFN $\gamma$ e IL 9	Interleucinas proinflamatorias	SE obtiene a partir de los resultados de citometría de flujo.	Dependiente	Valor numérico	Nominal

## UNIVERSO DEL ESTUDIO

Pacientes con psoriasis en placas de la consulta externa del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua y pacientes sin enfermedades dermatológicas a los que se les realizó abdominoplastia del departamento de cirugía plástica del CMN Siglo XXI.

## TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = N Z^2 (P*Q) / d^2 (N - 1) + Z^2 P Q$$

$$n = N (1.96)^2 (0.02) (0.98) / (0.05)^2 (N - 1) + (1.96)^2 (0.02) (0.98)$$

$$n = 120,000 (0.07530) / (0.0025) (120,000 - 1) + 0.07530$$

$$n = 30.11$$

En donde, N = tamaño de la población Z = nivel de confianza, P = probabilidad de éxito, o proporción esperada Q = probabilidad de fracaso D = precisión (Error máximo admisible en términos de proporción).

Tomando en cuenta que a nivel mundial afecta al 2 % de la población, se requerirían 30 pacientes.

## CRITERIOS DE SELECCIÓN

- CRITERIOS DE INCLUSION

1. Pacientes de 18 a 80 años con cualquier estado socioeconómico.
2. Pacientes con diagnóstico clínico de psoriasis en placas.

3. Pacientes con lesiones en cualquier topografía y porcentaje de superficie corporal afectada.
4. Pacientes que no hayan utilizado tratamiento tópico en el sitio de la biopsia en los últimos 15 días previos al estudio o tratamiento sistémico en el último mes, solo se permitirá el uso de emoliente.
5. Pacientes que bajo consentimiento informado hayan aceptado participar en el estudio.

- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes con psoriasis papulopustular.
2. Pacientes con psoriasis guttata.
3. Pacientes con psoriasis eritrodermica.
4. Pacientes que por ocupación o lugar de residencia no puedan acudir a control periódico.
5. Pacientes embarazadas o en periodo de lactancia.
6. Pacientes con alguna enfermedad autoinmune concomitante (rinitis, síndrome de Sjögren, enfermedad inflamatoria intestinal, Artritis reumatoide, Lupus Eritematoso sistémico o cutáneo, vitiligo, enfermedades autoinmunes tiroideas).

7. Pacientes en quienes exista la duda diagnóstica entre psoriasis y otra dermatosis.
8. Pacientes portadores del virus de inmunodeficiencia humana.
9. Pacientes en tratamiento que no puedan ser sometidos a lavado terapéutico secundario a la gravedad de su enfermedad.
10. Pacientes con algún tipo de neoplasia.
11. Pacientes que se encuentren bajo tratamiento con corticoides sistémicos o tópicos, anti psoriásicos como tazaroteno, retinoides, psoralenos, ácido salicílico, antralina, inmunosupresores o quimioterapia.
12. Pacientes bajo tratamiento con litio, beta bloqueadores adrenérgicos, antimaláricos.

## DESCRIPCION DE PROCEDIMIENTOS

### MUESTRAS DE PIEL

Se tomaron muestras de piel lesionada de pacientes adultos con diagnóstico clínico de psoriasis en placas en la consulta externa del Centro Dermatológico

“Dr. Ladislao de la Pascua”, previa explicación de los objetivos del protocolo y firma una carta de consentimiento informado.

Se tomaron en cuenta los siguientes criterios clínicos: pacientes con presencia de psoriasis en placas en cualquier topografía, así como superficie corporal afectada. La determinación de PASI fue confirmada por el jefe del Servicio de Psoriasis. Se realizó además una historia clínica completa incluyendo la parte dermatológica.

La piel lesionada fue obtenida mediante un huso de 1 a 2 cm aproximadamente.

#### SUSPENSIONES CELULARES DE DERMIS.

Las biopsias de los pacientes fueron tratadas durante toda la noche con Dispasa II para separar la epidermis de la dermis. La dermis fue colocada en medio de cultivo durante 6 días para permitir la migración de las células infiltrantes hacia el medio. Transcurrido el cultivo las células migrantes fueron cosechadas y contadas para su posterior tratamiento. Las células obtenidas fueron cultivadas por 3 días adicionales en presencia o en ausencia de la enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB; 1µg/mL).

#### CITOMETRÍA DE FLUJO.

Las suspensiones celulares obtenidas después del cultivo se tiñeron usando anticuerpos monoclonales que permiten la identificación de los linfocitos T cooperadores (TH) (anti-CD3 y anti-CD4). Posteriormente se trataron para teñir los factores de transcripción y/o citocinas intracelulares para identificar a las poblaciones TH17 convencionales y patogénicas con los anticuerpos anti- Ror $\gamma$ t, anti- Runx-1 y anti- T-bet, además de anti-IL-17A, anti-IFN- $\gamma$ . Esta tinción realizó usando el kit para tinciones intracelulares de eBioscience de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células marcadas se analizaron en un citómetro de flujo FACS Aria o FACS Canto. El análisis post-adquisición se realizó usando el paquete FlowJo versión 8.7 (TreeStar Inc.).

**RIESGO ÉTICO**  
Riesgo mayor al mínimo

**FLUJOGRAMA PROCESADO MUESTRAS**

Día 1 : Obtención de muestra de biopsia de piel lesionada y sin lesión

Día 2: Procesamiento de la muestra de piel para separación de dermis y epidermis. Inicio del cultivo de dermis.

Día 8: Recolección de las células emigrantes presentes en el cultivo de dermis de piel lesionada y sin lesión del paciente.

Día 8: Estimulación con superantígeno de las células obtenidas durante el cultivo de dermis.

Día 11: Recolección y procesamiento para tinción de citometría de flujo de las células estimuladas con superantígeno. También se colectan los sobrenadantes para la determinación de citocinas.

## INSTRUMENTO DE MEDICION PASI

PASI (PSORIASIS AREA AND SEVERITY INDEX)						
Area	SCA %	Eritema	Induración	Escama	Subtotal	Fecha de aplicación
Cabeza						Puntaje total
Tronco						Interpretación
M.T.						
M.P.						

## INSTRUMENTO DATOS INSTRUMENTO 1

Formato de consentimiento informado





**Carta de consentimiento informado**  
**Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua**  
**Secretaría de Salud Ciudad de México**  
**Departamento de enseñanza e Investigación UNAM**

“Identificación y cuantificación de linfocitos Th17 patogénicos en piel afectada de pacientes de 18ª 59 años, con Psoriasis activa, del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua.”

Lo(a) estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

El estudio servirá para evaluar las características de algunas células que están presentes en las lesiones de su piel y en su sangre y de esa manera ayudamos a conocer más de la enfermedad.

Usted ha sido invitado(a) a participar en este estudio porque tiene lesiones cutáneas consistentes con un cuadro de psoriasis en placas, por lo que pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto.

***Su participación en este estudio es completamente voluntaria.***

Por favor, lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar en este estudio. Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:

Le pediremos que asista a una visita, en la cual se le tomará una muestra de sangre y se le podrán realizar dos biopsias; la primera biopsia es de piel lesionada con psoriasis, y la segunda biopsia es de piel no lesionada.

Adicionalmente a estos procedimientos se le pedirá que responda algunas preguntas, por ejemplo: su edad, el tiempo que lleva enfermo (a), el tipo de medicamentos que ha tomado, en caso de que lo haya hecho, etc.

Para poder realizarle la toma de muestra de sangre

NO es necesario que se presente en ayuno.

1. Tomaremos una muestra de sangre venosa de uno de sus brazos, aproximadamente 15 mL o el equivalente a una cucharada sopera.
2. Nos tardaremos aproximadamente de 5 a 10 minutos en tomarle la muestra de sangre.

Las molestias que se producen durante la toma de muestra de sangre son mínimas; pero se puede ocasionar un poco de dolor o una discreta molestia, y es posible que se le pueda formar un moretón.

Con respecto a las biopsias:

En caso de la piel lesionada, la biopsia será tomada de una zona de piel que se encuentre afectada por una lesión de psoriasis al momento de su consulta. El sitio de la

biopsia será definido entre usted y el médico, ya que al ser un procedimiento que deja cicatriz, usted podría preferir que se realice en zonas no expuestas.

**No necesita presentarse en ayuno** o con alguna preparación especial, también es probable que presente dolor y/o ardor al momento de aplicar la anestesia y algunas molestias durante el procedimiento. En este caso la biopsia será tomada con bisturí y será de aproximadamente de 2 cm (semejante al largo de la uña del dedo pulgar). La toma de biopsia tomará de 15 a 20min; y como se comentó anteriormente este procedimiento deja una cicatriz permanente en el sitio. El sitio de la biopsia puede presentar dolor o incomodidad una vez que haya pasado el efecto de la anestesia. Deberá seguir las indicaciones del médico del estudio en cuanto al cuidado de la herida para evitar cualquier complicación posterior, como pudieran ser ruptura de puntos o infecciones.

Posteriormente a la toma de la primera biopsia, la de piel lesionada, se procederá a tomar una biopsia, la cual es opcional, de piel no lesionada. La toma de la biopsia de piel no lesionada seguirá el mismo procedimiento, con la diferencia que en este caso se usará, para su extracción, un sacabocado quirúrgico de 6mm. El corte es un poco mayor al tamaño de un confeti. De forma similar a la biopsia anterior, ésta también deja una cicatriz permanente y puede presentar dolor e/o incomodidad una vez que pase el efecto del anestésico. Asimismo deberá seguir las indicaciones de su médico para evitar complicaciones. Finalmente, en una minoría de casos se ha reportado la aparición de una nueva lesión psoriática en el sitio de la biopsia (posible fenómeno de Koebner), por lo que reiteramos que, aunque de gran utilidad para el estudio, esta biopsia de piel no lesionada es opcional.

Le reiteramos que su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, de cualquier manera recibirá la atención médica que suele recibir en esta institución. Esto es, su decisión de no participar no afectará su relación con la misma y tampoco afectará su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio tampoco modificará de ninguna manera la atención médica que se le brinda.

Usted puede hacer las preguntas que desee al inicio o a lo largo del estudio a las personas encargadas

de éste.

La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla/o (como su nombre, teléfono, dirección, etc.) será guardada de manera confidencial y por separado, al igual que sus respuestas a los cuestionarios y los resultados de sus pruebas clínicas, en caso de ser solicitadas; todo esto con la finalidad de garantizar su privacidad.

El equipo de investigadores, su médico en el Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua, su médico familiar y las personas que estén involucradas en el cuidado de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información que usted nos proporcione durante su participación en este estudio.

Su información personal solo será liberada si fuera necesario para proteger sus derechos o su bienestar (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si lo requiere la ley.

Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias o congresos, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos.

Las muestras y células obtenidas a partir de ellas no se usarán para extracción de material genético ni para la generación de líneas celulares inmortalizadas. En caso de que algún resultado obtenido sugiriera que podría ser de importancia realizar estudios genéticos se le informará y se tomará un nuevo consentimiento informado, el cual estará usted en completa libertad de aceptar o rechazar.

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 9:00 a 16:00 hrs., de lunes a viernes con la Dra. Laura Bonifaz Alfonzo, que es la investigadora responsable del estudio a los teléfonos: 5627 6900 ext. 21370, en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica ubicada en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

En caso de presentarse alguna molestia o complicación relacionada con la toma de la muestra de sangre o la biopsia, deberá comunicarse con su médico local responsable del estudio, quien le brindará la atención médica necesaria.

*Dr. César Maldonado*

*Clínica de Psoriasis Centro Dermatológico Dr. Ladislao  
de la Pascua Tel. 55 32 56 38 ext: 310*

*Dra. Elizabeth González  
Ladislao de la Pascua*

*Tel 3314405*

Asimismo, si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables del Comité de Ética en Investigación del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua, al teléfono 55387033, de 9:00 a 15:00 hrs.

Declaratoria del Paciente.

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio y además he leído el contenido del presente formato de consentimiento informado. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha proporcionado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Deseo proporcionar la biopsia de piel no lesionada      (SI)      (NO)

---

Nombre del Participante

---

Firma del Participante

---

Fecha y hora

Declaratoria de quien toma el consentimiento informado.

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas y considero que comprendió la información descrita en este documento y que libre y voluntariamente proporciona su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

---

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

---

Firma del encargado de obtener el CI

---

Fecha y hora

Declaratoria de testigos.

Mi firma como testigo certifica que el/la participante accedió a participar en el estudio, que todas sus preguntas y dudas fueron contestadas a su satisfacción y firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia y de manera voluntaria.

---

Nombre del Testigo 1

Parentesco con participante

---

Firma del Testigo

---

Fecha y hora

---

Nombre del Testigo 2

Parentesco con participante

---

Firma del Testigo

---

Fecha y hora

## INSTRUMENTO 2

Artículo del Journal of Investigative Dermatology



# Accepted Manuscript

SEB stimulation induces functional pathogenic features in Th17 cells from psoriasis patients

Octavio Castro-Escamilla, Cristina Aguilar-Flores, Luz María Mora-Velandia, Karina Morán-Martínez, Diana Edith Fernández-Madinaveitia, Alicia Lemini-López, Elizabeth González-Palacios, César Maldonado-García, Fermín Jurado-Santa Cruz, Gibrán Pérez-Montesinos, Laura C. Bonifaz

PII: S0022-202X(18)32048-7

DOI: [10.1016/j.jid.2018.05.024](https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.05.024)

Reference: JID 1456

To appear in: *The Journal of Investigative Dermatology*

Received Date: 21 December 2017

Revised Date: 25 May 2018

Accepted Date: 29 May 2018

Please cite this article as: Castro-Escamilla O, Aguilar-Flores C, Mora-Velandia LM, Morán-Martínez K, Fernández-Madinaveitia DE, Lemini-López A, González-Palacios E, Maldonado-García C, Jurado-Santa Cruz F, Pérez-Montesinos G, Bonifaz LC, SEB stimulation induces functional pathogenic features in Th17 cells from psoriasis patients, *The Journal of Investigative Dermatology* (2018), doi: 10.1016/j.jid.2018.05.024.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



**SEB stimulation induces functional pathogenic features in Th17 cells  
from psoriasis patients**

Octavio Castro-Escamilla<sup>1,2</sup>, Cristina Aguilar-Flores<sup>1,3</sup>, Luz María Mora-Velandia<sup>1</sup>, Karina Morán-Martínez<sup>4</sup>, Diana Edith Fernández-Madinaveitia<sup>5</sup>, Alicia Lemini-López<sup>6</sup>, Elizabeth González-Palacios<sup>4</sup>, César Maldonado-García<sup>4</sup>, Fermín Jurado-Santa Cruz, Gibrán Pérez-Montesinos<sup>4</sup> and Laura C. Bonifaz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades Centro

Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México City, México.

<sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, México.

<sup>3</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN), México City, México.

<sup>4</sup>Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”, Secretaría de Salud de la Ciudad de

México,  
México City,  
México.

<sup>5</sup>Servicio de Dermatología, Hospital General de Zona 1 A Venados, Instituto Mexicano del

Seguro Social,  
México City,  
México.

<sup>6</sup>Servicio de Dermatología, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México City, México.

This work was done in the Ciudad de México, México City, México.

Correspondence: Laura C. Bonifaz, PhD. Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Avenida Cuauhtémoc #300 Col. Doctores, Cuauhtémoc, México City, México. E-mail: [labonifaz@yahoo.com](mailto:labonifaz@yahoo.com)

**Short title:** Pathogenic features in Th17 cells from psoriasis.

**Abbreviations:** IL-17, Interleukin 17; IFN- $\gamma$ , Interferon gamma; LS, Lesional Skin; NLS, Non Lesional Skin; PASI, Psoriasis Area Severity Index; PB, Peripheral Blood; SEB, *Staphylococcus aureus* enterotoxin-B; Th, T helper Lymphocytes.

**T  
O  
T  
H  
E  
E  
D  
I  
T  
O  
R:**

Psoriasis is a chronic inflammatory cutaneous disease where CD4<sup>+</sup> T cell lymphocytes expressing IL-17 have been identified (Lowes et al., 2014), and IL-17 blockers have shown outstanding results in psoriasis treatment (Leonardi et al., 2012). Chronic inflammatory models have shown plasticity of Th17 cells to acquire Th1 features. Conventional Th17 cells express ROR $\gamma$ t and IL-17 but not IFN- $\gamma$ , whereas after plasticity, Th17 cells express ROR $\gamma$ t, T-bet, Runx1, and IFN- $\gamma$  and lose IL-17 expression (Lee et al., 2012). Thus, the balance of these master transcription factors and the cytokine environment including IL-1 and IL-23 (Annunziato et al., 2014) is critical in the regulation of the Th17 phenotype. Remarkably, after plasticity Th17 cells appear to have

increased proliferation (Maggi et al., 2012), and they are defined as pathogenic because they can exacerbate disease in experimental models (Hirota et al., 2011).

In human pathologies including psoriasis, high numbers of IL-17/IFN- $\gamma$  double-positive CD4<sup>+</sup>

T cells have been identified (Lowe et al., 2008; Kagami et al., 2010). Recently, the lesional skin microbiome in psoriasis patients exhibited an increased presence of *Staphylococcus aureus* (Alekseyenko et al., 2013; Tett et al., 2017). In addition, *Staphylococcus aureus* enterotoxin-B (SEB) superantigen has been associated with psoriasis severity (Balci et al., 2009). Therefore, we evaluated the Th17 cell features in 52 lesional (LS) and 30 non-lesional skin (NLS) biopsies of psoriasis vulgaris patients after SEB stimulation (Supplementary

Material). Medical ethics committees from the Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua and Instituto Mexicano del Seguro Social approved this study and written informed consent was obtained from all patients.

In LS, we found several  $CD4^+$ ,  $CD4^+ ROR\gamma t^+$  T cells and some  $CD4^+ ROR\gamma t^+$  cells compared

with NLS from the same patient (Figure 1a). The number of Th17 cells determined through the expression of transcription factor  $ROR\gamma t$  (Supplementary Figure S1a) was higher in LS than that in NLS (Figure 1b). SEB stimulation increased the expression of  $ROR\gamma t$  in  $CD4^+$  T cells and T-bet in Th17 cells in both LS and NLS, whereas Runx1 expression was only increased in LS (Figure 1c, Supplementary Figure S1b). These findings are consistent with a decrease and an increase in the percentage of conventional Th17 and pathogenic Th17 cell phenotypes in LS, respectively (Figure 1d). Moreover, the pathogenic/conventional index increased significantly in NLS and LS after SEB stimulation (Figure 1e). Interestingly, after SEB activation the percentage of Th17 cells with a pathogenic phenotype increased only in patients with large plaques (Figure 1f). These results indicate that SEB stimulation increases the pathogenic phenotype of Th17 cells, suggesting an association with the large plaque form of the disease.

Considering the mixture of conventional and pathogenic Th17 lymphocytes in NLS and LS, we sought to determine the *in situ* expression of IL-17 and IFN- $\gamma$  in  $CD4^+$  T cells. NLS contains few  $CD4^+$  T cells, and we could not detect the expression of IL-17 and IFN- $\gamma$ . In contrast, LS images of the same patient showed high  $CD4^+$  T cell infiltration that expressed either IL-17 or

IFN- $\gamma$  and, strikingly, IL-17/IFN- $\gamma$  double-positive CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 2a, white arrows).

Next, we evaluated whether SEB stimulation impacted the function of Th17 cells. In LS, most Th17 cells lack IL-17 but highly express IFN- $\gamma$  while a small population expresses both IL-17 and IFN- $\gamma$  after SEB stimulation. In contrast, there were IL-17<sup>+</sup> and IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and fewer

IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th17 cells after PMA/ionomycin activation (Figure 2b). In NLS, healthy skin or another skin pathology such as atopic dermatitis, Th17 cells lack or have a lower expression of IL-17 and IFN- $\gamma$  after activation (Supplementary Figure S2a). In addition, in patients with a high PASI score, SEB stimulation induces a pathogenic microenvironment as evidenced by significant quantities of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and low levels of IL-17 and IL-9 (Supplementary Figures S3a-S3d). These results strongly suggest the acquisition of functional plasticity features in Th17 cells from LS after SEB stimulation; this could be explained by the increase in Runx1 only in LS, which could dimerize with T-bet and in turn inhibit IL-17 expression (Lazarevic et al., 2010).

To elucidate whether the acquisition of plasticity features in Th17 cells was restricted to skin-resident Th17 cells, we compared the proliferation and cytokine expression of Th17 cells from LS and peripheral blood (PB) from the same patient. LS cells without stimulation showed proliferation, which increased after SEB stimulation, whereas PB cells showed lower proliferative capabilities (Figure 2c). Interestingly, the expansion of CD4<sup>+</sup> T cells from LS occurred with increased expression of the transcription factors ROR $\gamma$ t and T-bet (Figure 2c). In addition, the plasticity features were evaluated with another TCR stimulus such as anti-CD3/CD28. After SEB stimulation the Th17 cells from LS only expressed IFN- $\gamma$ , whereas the anti-CD3/CD28-stimulated cells were IL-17<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. In contrast, after SEB or anti-

CD3/CD28 activation of the PB Th17 cells we found IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup>, and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells

(Figure 2d). These results suggest that the acquisition of plasticity features in Th17 cells occurs in LS and PB after SEB or anti-CD3/CD28 stimulation; however, fully functional plasticity features were observed only in LS.

Finally, using CD161 as a Th17 cell marker (Cosmi et al., 2008), we sorted the Th17 cells from the PB of psoriasis patients (Supplementary Figure S4a) and investigated whether

plasticity features are acquired in isolated cells with TCR stimulation only or TCR stimulation with IL-1 $\beta$  and IL-23, which are increased in LS (Pietrzak et al., 2008). After activation with anti-CD3/CD28 or anti-CD3/CD28 plus cytokines we found an increased expression of ROR $\gamma$ t and T-bet. The Th17 cells activated with anti-CD3/CD28 expressed both IL-17 and IFN- $\gamma$ ; however, anti-CD3/CD28 plus cytokine stimulation showed a decrease in IL-17<sup>+</sup> and

increase in IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells (Figure 2e). We also found the proliferation of Th17 cells after anti-

CD3/CD28 activation, whereas the cytokines induced a more robust proliferation in the last cycle (Figure 2f). These results suggest that proliferation and plasticity features are acquired in isolated Th17 cells after TCR stimulation and can be enhanced by the presence of inflammatory cytokines. This research unveils a role for SEB in the physiopathology of psoriasis through the induction of plasticity features of Th17 cells towards a pathogenic profile that could contribute to inflammation. The acquisition of Th17 plasticity features might have implications in disease severity and in the biological treatment of psoriasis patients.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors state that there are no conflicts of interest.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank all of the patients that kindly accepted to participate in this study. We thank Dr. Vadim Pérez Koldenkova and Jessica Lakshmi Prieto Chávez for their technical support in confocal microscopy and flow cytometry at Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada and the Centro de citometría from Coordinación en Salud at Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS. We acknowledge the Academic Writing Team of the Centro de Estudios de Posgrado, UNAM for their help with this manuscript. This study was

funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE (S00082017/1-290138). OCE is doctoral student from Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM and received fellowship 267839 from CONACYT. CAF received fellowship 621839 from CONACYT.

**R  
E  
F  
E  
R  
E  
N  
C  
E  
S**

Alekseyenko AV, Perez-Perez GI, De Souza A, Strober B, Gao Z, Bihan M, et al. Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis. *Microbiome*. 2013 Dec 23;1(1):31. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities. *Immunology*. 2014 Oct 5;144(3):343–51.

Balci DD, Duran N, Ozer B, Gunesacar R, Onlen Y, Yenin JZ. High prevalence of *Staphylococcus aureus* cultivation and superantigen production in patients with psoriasis. *Eur J Dermatol*. 2009 May;19(3):238–42.

Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin

17-producing cells originate from a CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cell precursor. *J Exp Med*. 2008 Aug

4  
;  
2  
0  
5  
(  
8  
)  
:  
1  
9  
0  
3  
–  
1  
6  
.

Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, et al. Fate mapping of IL-17- producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol. Nature*. 2011 Jan 30;12(3):255–

6  
3  
.

Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Investig Dermatol*. 2010 May;130(5):1373–83.

Lazarevic V, Chen X, Shim J-H, Hwang E-S, Jang E, Bolm AN, et al. T-bet represses T. *Nat*

*Immunol*. 2010 Dec 12;12(1):96–104.

Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol.* 2012 Sep 9;13(10):991–9.

Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E, et al. Anti- interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med.*

2012 Mar  
29;366(13):  
1190–9.

Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, et al. Psoriasis

Vulgaris Lesions Contain Discrete Populations of Th1 and Th17 T Cells. *J Invest Dermatol.*

2008 Jan  
17;128(5):  
1207–11.

Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of Psoriasis. *Annu Rev Immunol.*

2014 Mar  
21;32(1):  
227–55.

Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Rossi MC, Querci V, Mazzoni A, et al.

Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *Eur J Immunol.* 2012 Oct

2  
5  
;  
4  
2  
(  
1  
2

)  
:  
3  
1  
8  
0  
—  
8  
.

Pietrzak AT, Zalewska A, Chodorowska G, Krasowska D, Michalak-Stoma A, Nockowski P, et al. Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin Chim Acta*. 2008 Aug;394(1-2):7–21.

Tett A, Pasolli E, Farina S, Truong DT, Asnicar F, Zolfo M, et al. Unexplored diversity and strain-level structure of the skin microbiome associated with psoriasis. *Biofilms and Microbiomes*. 2017 Jun 13:1–11.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Increased pathogenic phenotype in Th17 cells after SEB stimulation in LS of psoriasis patients.** (a) NLS and LS Immunofluorescence with anti-CD4 (green), anti-ROR $\gamma$ t (red) and nuclei (blue). Arrows indicate CD4<sup>+</sup>/ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> (yellow) and CD4<sup>-</sup> ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells (red). (b) Percentage and absolute numbers of Th17 cells in NLS and LS. (c) Median fluorescence

intensities (MFI) of ROR $\gamma$ t, T-bet and Runx1 before and after SEB treatment. (d) Representative plots and percentages of conventional and pathogenic Th17 cells in NLS and LS. (e) Pathogenic/conventional index, according to the cell percentage in each condition. (f) Percentage of conventional and pathogenic Th17 cells in patients with small and large plaques after SEB stimulation. NLS n=23, LS n=38. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 Mann-Whitney U test. Wilcoxon's signed-rank test.

**Figure 2. SEB and CD3/CD28 induce functional plasticity features in the Th17 lymphocytes of psoriasis patients.** (a) NLS and LS Immunofluorescence for CD4 (green), IL-17 (red), IFN- $\gamma$  (cyan) and nuclei (blue). Zoom region (white square). Arrows indicate CD4<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> (yellow), CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (cyan) and CD4<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (white) cells. Representative of three patients. (b) Plots and percentage of the Th17 cells IL-17<sup>+</sup> or IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> after SEB or PMA/ionomycin activation (P/I) (n=10). (c) CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and expression of ROR $\gamma$ t and T-bet after SEB treatment. (d) IL-17<sup>+</sup> or IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th17 cells after SEB or anti-CD3/CD28 stimulation. (LS orange plots, PB red plots). (e) Expression of ROR $\gamma$ t, T-bet, IL-17, IFN- $\gamma$  and (f) proliferation in purified PB Th17 cells after CD3/CD28 or CD3/CD28 plus IL-1 $\beta$ /IL-23 stimulation. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Wilcoxon's signed-rank test.

## RECURSOS HUMANOS

- Dr. César Maldonado. Realizó la evaluación y entrevista al paciente y en casos necesarios obtuvo el consentimiento informado. Asimismo, realizó personalmente o supervisó directamente a un residente en el procedimiento quirúrgico para obtener las biopsias de piel lesionada y sin lesión. Realizó también la evaluación física del paciente para determinación del PASI. Participó limitadamente en el procesamiento y análisis de las muestras.
- QFB, Candidato a Dr. Gibran Pérez Montesinos. Realizó la obtención de algunos consentimientos informados, procesó y analizó algunas de las biopsias de piel lesionada y sin lesión.
- Candidato a Dr. Octavio Castro Escamilla (Miembro de la UIMIQ). Realizó el procesamiento y análisis de las biopsias de piel lesionada y sin lesión.
- Dra. Elizabeth González Palacios. Realizó reclutamiento de pacientes, toma de biopsias, toma de consentimiento informado, Calculo de PASI, evaluación física del paciente, y participó cuando fue posible en el análisis de las muestras de biopsias de piel lesionada.
- Residentes del Centro Dermatológico Pascua. Primer contacto de pacientes y evaluación de posibles candidatos para el estudio, así mismo cuando fue necesario realizaron cálculo de PASI y toma de biopsias.

## RECURSOS MATERIALES

- Material para la extracción de las biopsias. (Será proporcionado por la UIMIQ).
- Anestésico (Proporcionado por el Dermatológico Pascua).
- Material de flebotomía (Proporcionado por la UIMIQ).
- Centrífuga (Inmunodermatología y/o UIMIQ).
- Campana de flujo laminar (Inmunodermatología y/ UIMIQ).
- Incubadora de CO<sub>2</sub> (UIMIQ).
- Insumos de laboratorio (UIMIQ).
- Citómetro de flujo (UIMIQ).
- Hojas tamaño carta para la recolección de consentimiento informado y datos.
- Plumas y Lápices.
- Computadora con programa SPSS y/o GraphPad Prism para análisis y recolección de datos.
- Impresora para impresión de consentimiento informado e historia clínica.

## RECURSOS FÍSICOS

- Consultorios del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, donde se tendrá el primer contacto con el paciente y reclutamiento de estos.

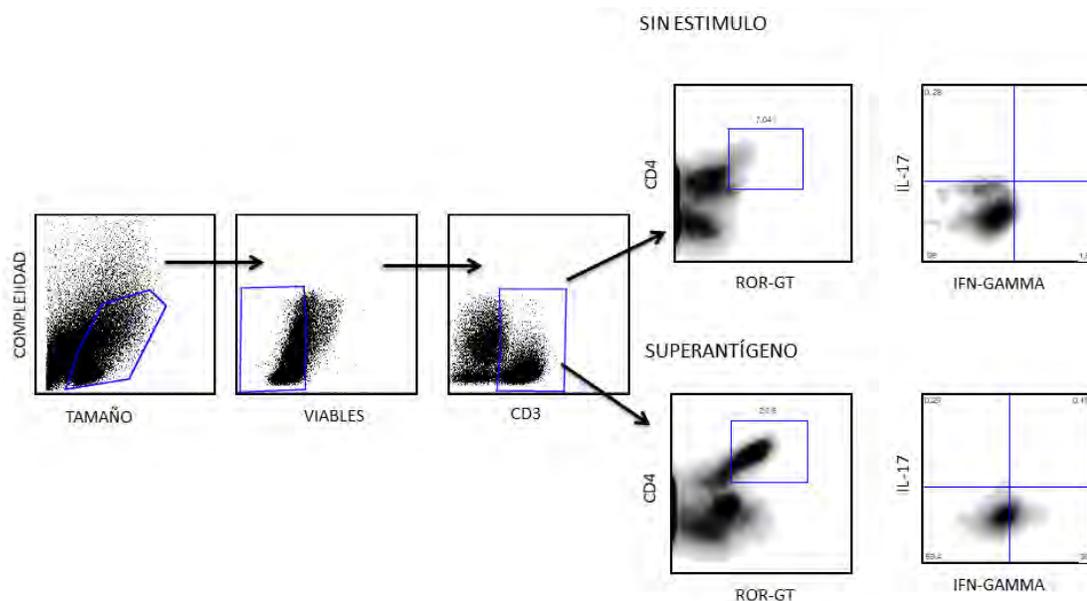
- El laboratorio de inmunodermatología cuenta con una campana de flujo laminar, así como una centrífuga para poder llevar a cabo el procesamiento inicial de las biopsias de piel.
- El laboratorio de la unidad de investigación médica en inmunoquímica en el CMN siglo XXI, cuenta también con campanas de flujo laminar, centrífugas e incubadoras para cultivos celulares y de tejidos, y es aquí donde se realizará la obtención de linfocitos infiltrantes. Asimismo, cuenta con acceso a citómetros de flujo que permitirán hacer el análisis de las poblaciones de linfocitos TH17.

## **RESULTADOS**

### **ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE CITOCINAS INTRACELULARES**

Una vez extraídas las células de la epidermis, éstas se incubaron en un amortiguador para posteriormente determinar la viabilidad de los linfocitos T (células CD3<sup>+</sup>) y se realizaron tinciones para identificar los linfocitos TH17 patogénicos de los no patogénicos usando anticuerpos específicos para CD4, ROR $\gamma$ t, T-bet, Runx-1, IL-17 e IFN- $\gamma$ . Todas las muestras se estimularon con SEB para identificar las mismas citocinas que en las células basales (figura 1).

Esta estrategia se utilizó en todas las muestras de los pacientes.



**Figura 1.** Estrategia de análisis para citocinas intracelulares. Se determinó la viabilidad de las células obtenidas y se analizaron los linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Las células TH17 se identificaron por co-expresión de CD4 y ROR $\gamma$ t. La expresión de IL-17 e IFN- $\gamma$  se estudió en esta población.

## PACIENTES

En la tabla I se muestran las características clínicas de los pacientes reclutados.

FOLIO	INICIALES	EDAD	SEXO	TIPO PSORIASIS	PASI	COMORBILIDADES	EVOLUCION (MESES)
1	FMO	59	masculino	Grandes	7.99	NINGUNA	180
2	RSLP	26	femenino	Pequeñas	3	OTROS	120
3	MHDL	33	femenino	Grandes	6.7	NINGUNA	6
4	ADJL	55	masculino	Grandes	2.4	DISLIPIDEMIA, TABAQUISMO, DM2	24
5	BVGM	60	femenino	Grandes	5.3	OBESIDAD	156
6	AGMA	37	femenino	pequeñas	0.98	OBESIDAD	36
7	GGMA	55	masculino	Grandes	5.5	DISLIPIDEMIA	204
8	PZG	45	masculino	Grandes	6.2	NINGUNA	24
9	SRJLR	61	Masculino	Grandes	5.3	DM2, TABAQUISMO	12

10	HFM	25	Masculino	pequeñas	7.1	NINGUNA	12
11	OAC	44	Masculino	pequeñas	7.8	NINGUNA	132
12	CCML	56	Femenino	Grandes	9.2	NINGUNA	24
13	MGA	33	Masculino	Grandes	18.9	NINGUNA	108
14	AQC	60	masculino	Grandes	7.8	HAS	12
15	VCMT	80	femenino	Grandes	6.6	HAS	60
16	ACJ	46	femenino	Grandes	15	DISLIPIDEMIA	12
17	AGR	64	masculino	Grandes	5.3	NINGUNA	12
18	LCC	24	femenino	Pequeñas	2.9	TABAQUISMO	36

**Tabla I.** Características clínicas pacientes HAS (Hipertensión Arterial sistémica), DM (Diabetes Mellitus tipo2).

Se obtuvieron en total 18 pacientes 10 hombres y 8 mujeres con una media de edad de 47.9 años (Desviación estándar; D.E. de 15.4), con una media de evolución de 65 meses (D.E. 66.1), PASI con una media de 6.88 (D.E. 4.3). Del total de pacientes, 9 (50 %) no presentaban comorbilidades, dos pacientes presentaban obesidad (11.11%), tres pacientes tabaquismo (16.66%), dos Hipertensión Arterial Sistémica (11.11%), tres poseían Dislipidemia (16.66%), y dos de ellos Diabetes Mellitus tipo 2 (11.11%).

El 72 % de los pacientes presentaba psoriasis en placas grandes. Dos de las 18 muestras obtenidas (folios 18 y 17) presentaron contaminación del cultivo por lo que la medición de citocinas intracelulares no fue posible; dejándonos un total de 16 muestras para analizar.

En la tabla II se muestran los resultados del porcentaje de linfocitos T TH17 (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> RORγt<sup>+</sup>) que expresaban las citocinas IL-17 ó INFγ en estado basal o bien cuando fueron estimuladas con SEB. En algunas muestras, el

tejido fue insuficiente por lo que no se alcanzaron a realizar algunas determinaciones (NA).

FOLIO	%TH17 IL-17+ SIN ESTIMULO	%TH17 IL-17+ SEB	%TH17 INF- $\gamma$ + SIN ESTIMULO	%TH17 INF- $\gamma$ + SEB
1	0	1.95	0.8	69.4
2	0	0	0	55.3
3	0.72	0.18	0.66	29.2
4	0	0	3.73	28.9
5	0	0.45	2.39	10.8
6	1.5	NA	NA	NA
7	0.32	0.5	3.96	18.1
8	0.19	0.9	2.11	11.8
9	2.31	7.53	0.77	30.1
10	2.61	3.96	3.96	13.6
11	0.77	1.9	0.55	13.3
12	0.56	7.47	0.53	8
13	0.58	3.97	0.21	0.5
14	0.31	4	0	21.1
15	0.2	0.29	1.73	30
16	0	1.94	5.88	40.8
17	MUESTRA CONTAMINADA			
18	MUESTRA CONTAMINADA			

**Tabla II.** Porcentaje de linfocitos TH17 productores de las citocinas IL-17 o IFN- $\gamma$  por folio y estimuladas con SEB y sin estímulo. NA (no aplica).

Para todos los datos se realizaron pruebas de normalidad y en aquéllos donde se observaba una distribución normal se realizaron pruebas paramétricas y en las que no se obtuvo una distribución normal; pruebas no paramétricas. Se usaron los programas IBM SPSS y el programa Prism de GraphPad para realizar mediciones, correlaciones y los gráficos de relación de variables. Para

todos los valores de tomará un resultado significativamente estadístico si la P es menor a 0.05.

## IL-17A

Se obtuvo un valor mínimo de 0.0% y un máximo de 2.61% con una mediana de 2.33 y una D.E.  $\pm$  0.82% en IL17 A de muestra sin estímulo. En porcentaje de linfocitos TH17 que producían IL-17 al ser estimuladas con SEB se obtuvo una mínima de 0.00% máxima de 7.53%, mediana de 1.90% con una DE. de 2.54%.

Se compararon estos resultados en porcentaje contra el PASI y el tiempo de evolución. Además, se compararon los niveles de citocinas con estímulo de SEB y sin estímulo.

## PASI VS IL17

### SIN ESTIMULO.

Se observa que los datos no muestran una relación fuerte entre sí, siendo los valores de interleucina bajos sin importar el PASI. Con un coeficiente de correlación de 1 y un a P de 0.86.

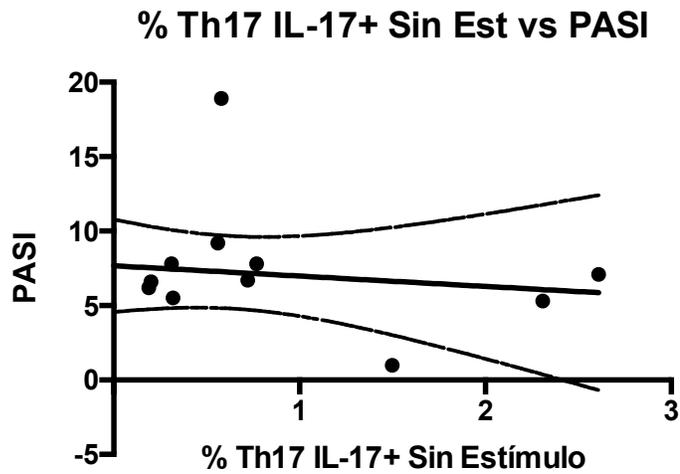


Figura 2

CON ESTIMULO CON SEB.

Al estimular las células se observa un aumento con tendencia a ser lineal, sin embargo, se muestran algunos valores atípicos que no muestran relación directa con el PASI. Se obtiene un coeficiente de correlación de 0.594 y una P de 0.019.

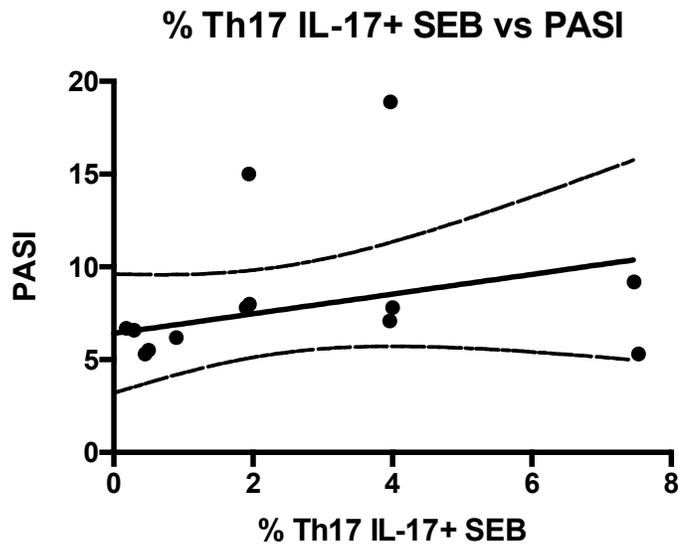


Figura 3

**TIEMPO DE EVOLUCION VS IL17**

SIN ESTIMULO

Al comparar el tiempo de evolución con la proporción de linfocitos TH17 productores de IL-17A observamos que se mantiene en valores bajos sin importar el tiempo de evolución, aunque se observa una ligera tendencia a disminuir con el tiempo sin llegar a ser significativa. Se obtiene un coeficiente de correlación de -0.335 con una P 0.205

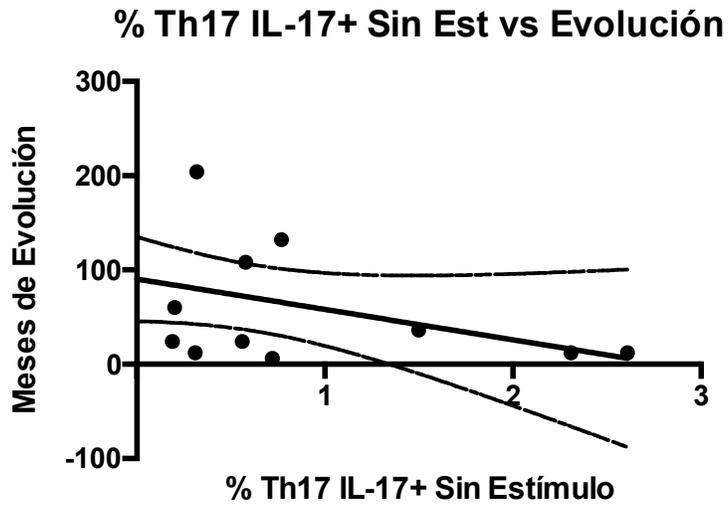
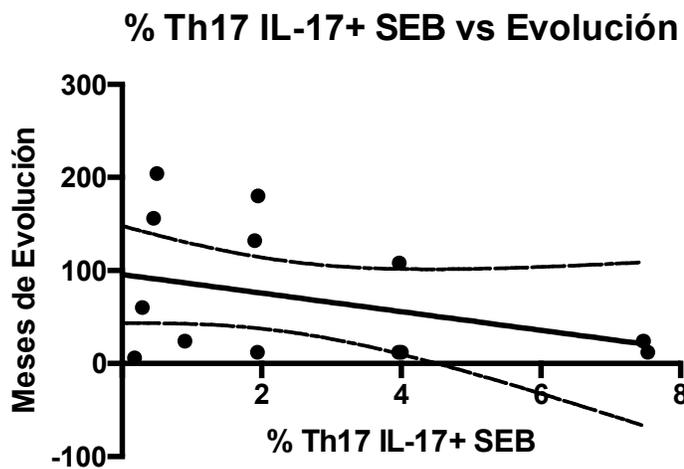


Figura 4

CON ESTIMULO CON SEB.

Al estimular con SEB notamos que la proporción de linfocitos TH17 que producen IL-17 aumenta, sin embargo, la tendencia anterior se mantiene, ya que se obtienen valores altos en pacientes con poco tiempo de evolución.

Se obtiene un coeficiente de correlación de -0.246 y una P de 0.376



## Figura 5

### IONOMICINA

Adicionalmente en un pequeño grupo de pacientes se realizó la activación celular con ionomicina y PMA. El PMA es un éster de forbol, el cual es un activador farmacológico de la PKC. La Ionomicina es un ionóforo que abre canales de calcio en la membrana de la célula. La combinación de Ionomicina y PMA induce una serie de eventos de activación que mimetizan los observados durante la activación fisiológica de la célula T. Obteniéndose los resultados mostrados en la tabla III.

FOLIO	IL-17A IONOMICINA/PMA	INF- $\gamma$ IONOMICINA/PMA
1	2.00	7.08
2	0.0	24.70
3	2.25	6.76
4	0.03	9.86
5	1.07	10.20
6	5.50	NA
15	7.73	4.01

**Tabla III.** Porcentaje de linfocitos TH17 productores de las citocinas IL-17 por folio y estimuladas con SEB o sin estímulo. NA (no aplica).

### **IL-17A CON ESTIMULO VS SIN ESTIMULO VS IONOMICINA**

Por último, se realizó una comparación entre los 3 grupos para determinar si realmente hubo una diferencia significativa en el porcentaje de linfocitos TH17 productores de IL-17A. A groso modo podemos observar que, con la activación, el porcentaje de linfocitos TH17 productores de IL-17 aumentó de manera considerable en el grupo con estimulado con SEB y en el grupo con ionomicina comparados con el control. Se realizó una prueba t de student para la comparación entre grupos obteniendo entre el grupo de estimulados con SEB y sin estímulo una p de 0.0017, y entre el grupo de ionomicina vs el grupo sin estímulo una p de 0.0313, ambas diferencias significativas, mientras que entre el grupo estimulado con ionomicina vs SEB no hay diferencia significativa (p de 0.0625).

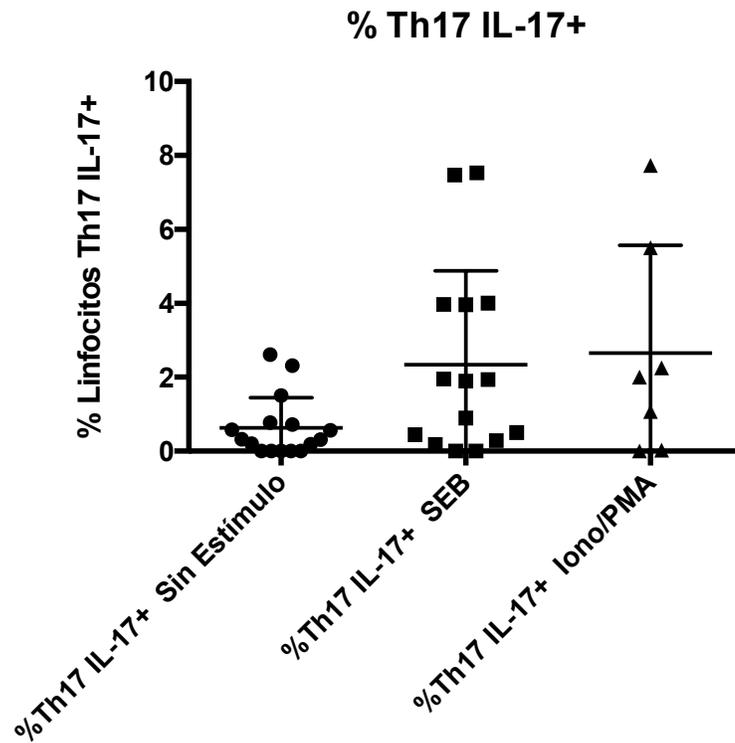


Figura 6

### INF $\gamma$

En muestras de piel sin estímulo, la proporción de linfocitos TH17 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> obtenida fue de un valor mínimo de 0.0%, un máximo de 5.88% una media de 1.81% con una D.E.  $\pm$  1.80. En las muestras con estímulo con SEB se obtuvo un mínimo de 0.5% un máximo de 69.4% con una media de 25.39% y una DE  $\pm$  18.55.

Se compararon estos resultados en porcentaje contra el PASI y el tiempo de evolución. Además, se compararon los niveles con estímulo y sin estímulo.

## PASI VS INF- $\gamma$ .

### SIN ESTIMULO.

Donde se muestra que la producción de dicha citocina es uniforme sin importar el PASI. Se realizó un coeficiente de correlación con un resultado de 0.032 y una P de 0.909.

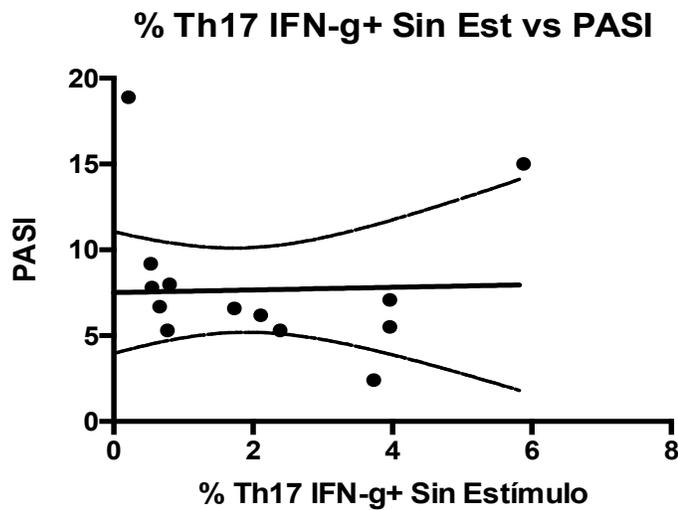
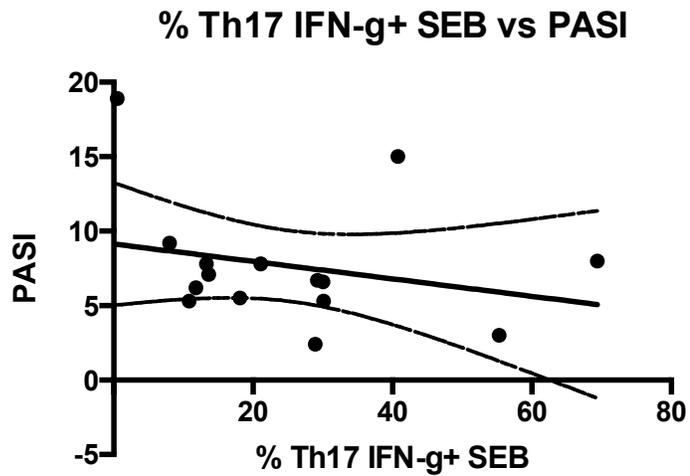


Figura 7

### CON ESTIMULO DE SEB.

Donde vemos que la producción de citocinas aumenta de forma general y es mayor en pacientes con PASI más bajos, se puede observar una relación débil lineal con tendencia negativa. Se realizó un coeficiente de correlación con un resultado de -0.256 con una P 0.356.



**TIEMPO DE EVOLUCION VS INF- $\gamma$**

**SIN ESTIMULO**

Observándose que a mayor tiempo de evolución en niveles basales hay mayor producción de INF- $\gamma$ , no obstante, los datos se encuentran dispersos, sin mostrar una relación clara entre sí. Con una correlación de -0.094 y una p de 0.739.

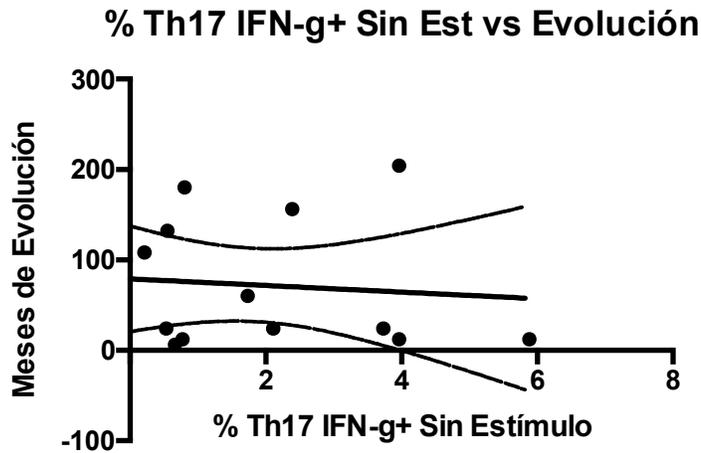


Figura 8

CON ESTIMULO DE SEB.

Se muestra que el tiempo de evolución es inversamente proporcional a la producción de INF- $\gamma$  con estimulo con SEB, con una correlación de 0.172 y una P de 0.539.

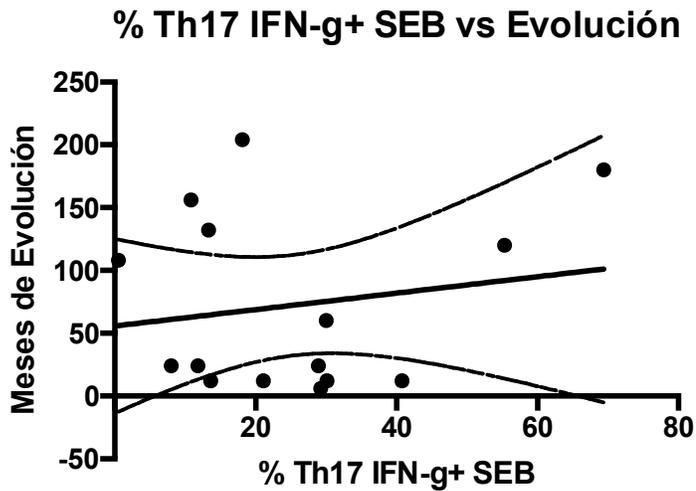


Figura 9

INF- $\gamma$  SIN ESTIMULO VS ESTIMULO CON SEB VS IONOMICINA.

Al comparar la producción de citocinas entre grupos se observa cómo, con estímulo, ya sea de SEB o de Ionomicina/PMA la proporción de células productoras de INF- $\gamma$  es mayor; los valores más altos se encuentran en el grupo estimulado con SEB lo que nos habla de una mayor activación de células TH17 patogénicas. Se realizó una prueba t de student para la comparación entre grupos obteniendo entre el grupo de sin estímulo vs el grupo estimulado con SEB una p de 0.0002, y entre el grupo de ionomicina vs el grupo sin estímulo una p de 0.0313, de nuevo, ambas diferencias significativas. A diferencia del caso de la proporción de linfocitos TH17 productores de IL-17, en el caso de los linfocitos TH17 productores de INF- $\gamma$  si hubo una diferencia significativa entre el grupo estimulado con ionomicina vs y el grupo estimulado con SEB (p de 0.0313).

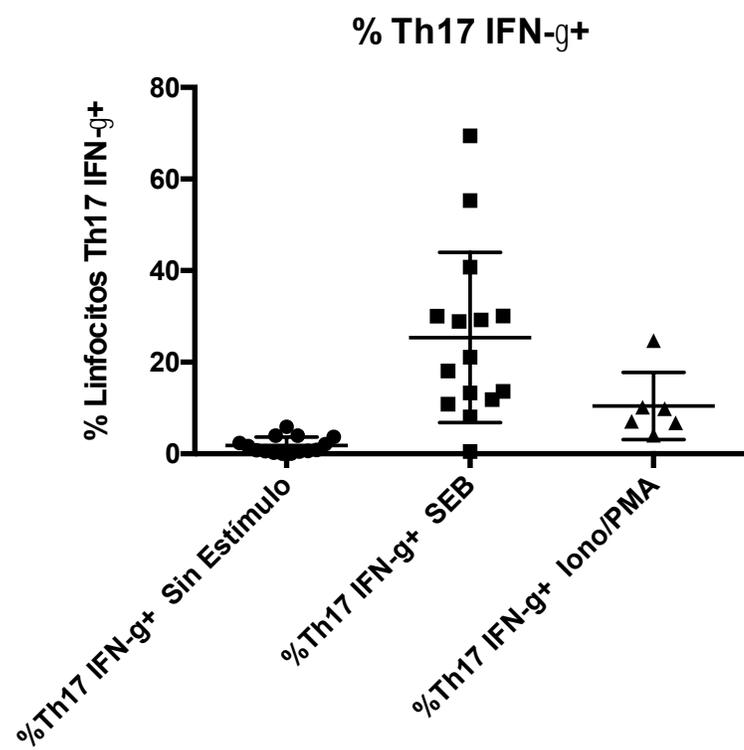


Figura 10

## **DISCUSIÓN**

Los linfocitos TH17 presentes en las lesiones de pacientes con psoriasis son capaces de producir, en estado basal, alguna de las citocinas determinadas, IL-17 o IFN- $\gamma$ , aunque lo hacen en bajas cantidades y su proporción no muestra una relación directa con el PASI o el tiempo de evolución.

Sin embargo, la relación entre la proporción de linfocitos TH17 productores de citocinas, una vez activadas las células con SEB, y el PASI resulta directamente proporcional con el porcentaje de linfocitos TH17 productores de IL-17A e inversamente proporcional al porcentaje de linfocitos TH17 productores de IFN- $\gamma$ , esto es, a mayor PASI mayor proporción de células IL-17<sup>+</sup> y menor proporción de linfocitos TH17 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.

Sin embargo, lo contrario ocurre cuando se comparan la proporción de linfocitos TH17 productores de IFN- $\gamma$  en células activadas, con el tiempo de evolución; ya que a mayor tiempo de evolución mayor proporción de linfocitos TH17 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, pero menor proporción de TH17 IL-17A<sup>+</sup>.

## CONCLUSIONES

Al comparar a los distintos grupos, podemos decir que, si se observa una diferencia significativa entre las células no activadas vs las células activadas, tanto en la proporción de linfocitos TH17 productores de IL-17 como en los productores de IFN- $\gamma$ , ya que, en éstas últimas, la proporción de ambas células aumenta de forma considerable.

Todo esto sugiere que, los linfocitos TH17 que están presentes en las placas psoriásicas, al activarse, manifiestan propiedades patogénicas, ya que existe un aumento significativo de éstos que es capaz de producir citocinas proinflamatorias TH17. Además, el aumento más importante es en los linfocitos productores de IFN- $\gamma$ , la cual promueve un ambiente proinflamatorio más importante. Esto lo podemos transpolar a la fisiopatología de la psoriasis donde en algunos casos, es alguna infección la que desencadena el cuadro clínico característico del mismo.

Dentro de las limitantes de este trabajo, la más importante es el reducido número de pacientes estudiados, ya que esto limita de forma importante el poder estadístico de las pruebas realizadas.

Es importante mencionar que los resultados obtenidos en este trabajo contribuyeron de manera significativa para la finalización de un manuscrito

sobre el tema, el cual ha sido aceptado para su publicación en el *Journal of Investigative Dermatology*; mismo que se adjunta a la presente tesis.(24)

## BIBLIOGRAFIA

1. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. *Pathogenesis and therapy of psoriasis*. Nature. 2007;445(7130):866–73.
2. Bologna, Jean L. Joseph Borizzo RR. *Dermatology*. second edi. USA: Elsevier Inc; 2008. 115-134 p.
3. Mortimer P. *Regular Review*. Lancet, The. 1984;289(August):339–42.
4. Wolff Klaus, Johnson Richard SA. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Seventh Ed. USA: MC Graw Hill Education; 2008. 169-193 p.
5. Chanussot C, Arenas Gúzman R. *Psoriasis. Estudio descriptivo y comorbilidades en 114 pacientes*. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. 2015;13(1):20–3.
6. Manuscript A. *Immunology of Psoriasis*. 2015;227–55.
7. Dubois Declercq, S; Pouliot R. *Promising new treatments for psoriasis Review Article*. Sci World J. 2013;2013:1–9.
8. Martin DA, Towne JE, Kricorian G, Klekotka P, Gudjonsson JE, Krueger JG, et al. *The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: preclinical and clinical findings*. J Invest Dermatol [Internet]. 2013;133(1):17–26. Available from:  
<http://www.nature.com/jid/journal/v133/n1/pdf/jid2012194a.pdf>
9. Mehlis SL, Gordon KB. *The immunology of psoriasis and biologic immunotherapy*. J Am Acad Dermatol. 2003;49(03):44–50.
10. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, et al. *Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1*

- and Th17 T cells*. J Invest Dermatol [Internet]. 2008;128(5):1207–11.  
Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5701213>
11. Albanesi C. Immunology of psoriasis [Internet]. 4th ed. *Clinical Immunology: Principles and Practice*: Fourth Edition. Elsevier Ltd.; 2012. 775-781 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7234-3691-1.00077-5>
  12. Bergstresser PR, Gilliam JN. *The immunology of psoriasis*. Pharmacol Ther. 1981;14(3):345–54.
  13. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. *Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells*. Nat Immunol. 2012;13(10):991–9.
  14. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DTW, et al. *Th17 cells in inflammation and autoimmunity*. Autoimmun Rev. 2014;13(12):1174–81.
  15. Peters A, Lee Y, Kuchroo VK. *The many faces of Th17 cells*. Curr Opin Immunol [Internet]. 2011;23(6):702–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2011.08.007>
  16. Maldonado CésarAlfonso, Cardona Miguel SCF. *Comorbilidades en psoriasis*. Rev Cent Dermalógico Pascua. 2013;22(1):15–21.
  17. Farías MM, Serrano V, de la Cruz C. *Psoriasis and Obesity: A Review and Practical Recommendations*. Actas Dermo-Sifiliográficas (English Ed. 2011;102(7):505–9.
  18. Yarwood JM, Leung DYM, Schlievert PM. *Evidence for the involvement of*

- bacterial superantigens in psoriasis, atopic dermatitis, and Kawasaki syndrome*. FEMS Microbiol Lett. 2000;192(1):1–7.
19. Skov L, Baadsgaard O. *Bacterial superantigens and inflammatory skin diseases*. Clin Exp Dermatol. 2000;25(1):57–61.
  20. Morán Martínez K. *Evaluación de linfocitos th17 patogénicos en piel lesionada de pacientes con psoriasis y su implicación clínica* [Internet]. 2013. Available from:  
<http://132.248.9.195/ptd2013/agosto/0698127/Index.html>
  21. AEDV G de trabajo de psoriasis de la. *¿ Cómo Se Mide La Gravedad De La Psoriasis ?* 2015;3–4.
  22. Schmitt J, Wozel G. *The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis*. Dermatology. 2005;210(3):194–9.
  23. Diani M, Altomare G, Reali E. *T Helper Cell Subsets in Clinical Manifestations of Psoriasis*. J Immunol Res. 2016;2016.
  24. Castro-escamilla O, Aguilar-flores C, Mora-velandia LM, Fernández-madinaveitia DE, Lemini-lópez A, Maldonado-garcía C, et al. *SEB stimulation induces functional pathogenic features in Th17 cells from psoriasis patients*. J Invest Dermatol [Internet]. 2018; Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.05.024>

