



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MIGRACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE  
SANGRE PERIFÉRICA EN RESPUESTA A  
ESTÍMULOS QUIMIOTÁCTICOS PRESENTES EN  
LA PIEL DE PACIENTES CON PSORIASIS  
ACTIVA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

\_\_\_\_\_

**VOCAL:** Profesor: MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRÍA

\_\_\_\_\_

**SECRETARIO:** Profesor: EDUARDO ANTONIO FERAT OSORIO

\_\_\_\_\_

**1er. SUPLENTE:** Profesor: JULIO CESAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

\_\_\_\_\_

**2º SUPLENTE:** Profesor: GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS

\_\_\_\_\_

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES (UIMEA) DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES BERNARDO SEPÚLVEDA EN EL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_

**DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO**

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_

**OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Laura Bonifaz Alfonzo por la oportunidad de trabajar en su laboratorio. También por la confianza, el entusiasmo y el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A Marcela, Gibrán, Aniela e Isaac por la paciencia, amabilidad, apoyo y sobre todo los consejos que me han dado durante mi estancia en el laboratorio.

A los miembros de la UIMEA, una excelente unidad.

A la Dra. Esther Guevara Saginés por el interés y la disposición para el reclutamiento de pacientes.

A la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo.

Al Dr. Eduardo Ferat Osorio por la revisión y comentarios de este trabajo. A Mónica Heras Chavarría por sus consejos y sus comentarios.

A Iván, Neri y Erick por ser tan leales sin importar el paso del tiempo.

A mis amigos Juanjo y Tania por ser confiables. Por su apoyo y por tantos momentos geniales juntos.

A los “joga” por aquellas tardes de deporte y a mis compañeros de clase por lo bien que la pasamos, incluso generando una amistad.

A los profesores que tuve a lo largo de mi carrera -incluidos los presentes- por ser profesionales y por lo comprometidos con la formación de los estudiantes.

A la UNAM por brindarme una experiencia única y completa. A la FQ por hacerme sentir orgulloso de mi estancia y de mi profesión.

## DEDICATORIAS

*Esta tesis esta dedicada a mis padres por el apoyo incondicional y el amor que me han dado a lo largo de mi vida. Gracias por dejarme crecer y ayudarme a ser lo que soy.*

*A mi hermana Elizabeth por el cariño y apoyo que nos damos. Siempre contaras conmigo.*

*A mis abuelas Carmen y Alicia porque se que me cuidan desde donde están.*

*A Vero, Bony y Omar por ser un ejemplo de lucha y perseverancia.*

*A Ulises, Arturo, Lupita, Rafa y Yanet por ser como mis hermanos mayores.*

*A Diana, por la inmensa comprensión y el apoyo sin medida que me has brindado. Eres mi amor, mi motivo y mi inspiración.*

## INDICE:

Índice de figuras.....	i
Abreviaturas.....	ii
Resumen.....	iii
1.Introducción.....	1
2.Antecedentes.....	5
• Estructura y organización de la piel.....	5
• La piel como parte del sistema inmune.....	7
• Células dendríticas.....	7
○ Funciones y clasificación.....	7
• Células dendríticas en sangre periférica.....	8
○ Células dendríticas convencionales.....	9
○ Células dendríticas convencionales M-DC8.....	10
○ Células dendríticas plasmacitoides.....	11
• Células dendríticas en piel.....	12
○ Células dendríticas epidermales.....	12
○ Células dendríticas dermales.....	13
▪ DCs inflamatorias dermales.....	13
▪ DCs plasmacitoides.....	14
• Quimiotaxis y quimiocinas.....	15
○ Quimiotaxis.....	15
○ Quimiocinas.....	16
○ CXCR4 y CXCL12.....	17
3. Antecedentes directos al trabajo.....	18

4.Justificación.....	20
5.Hipotesis.....	21
6.Objetivos.....	21
7.Metodología.....	22
8.Resultados.....	27
9. Discusión de resultados.....	43
10.Conclusiones.....	49
Referencias.....	50

**INDICE DE FIGURAS**

Figura 1.....6

Figura 2.....16

Figura 3.....18

Figura 4.....24

Figura 5.....27

Figura 6.....28

Figura 7.....29

Figura 8.....30

Figura 9.....31

Figura 10.....32

Figura 11.....34

Figura 12.....35

Figura 13.....36

Figura 14.....37

Figura 15.....39

Figura 16.....40

Figura 17.....41

Figura 18.....42



## ABREVIATURAS

Ag. Antígeno.  
BDCA. "Blood Dendritic Cell Antigen".  
CL. Células de Langerhans.  
CLA. Antígeno Leucocitario Cutáneo.  
CPA. Células Presentadora de Antígeno.  
cDCs. Células Dendríticas convencionales.  
DCs. Células Dendríticas.  
DNA. Acido Desoxirribonucleico.  
ELISA. "Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay".  
HLA-DR. Antígeno Leucocitario Humano clase DR.  
iDCs. Células dendríticas inflamatorias.  
IFN. Interferón.  
IL. Interleucina.  
iNOS. Sintasa del oxido nítrico inducible.  
LIN<sup>-</sup>. Linaje negativo.  
LT. Linfocito T.  
PAMPs. Patrones moleculares asociados a patógenos.  
PASI. Índice de severidad y área de psoriasis.  
PBMC. Células mononucleares de sangre periférica.  
pDCs. Células dendríticas plasmacitoides.  
PRR. Receptor de reconocimiento de patrones.  
PSGL1. Ligando 1 de la P-Selectina.  
PSORS. Locus de susceptibilidad a psoriasis.  
RI. Respuesta inmune.  
RNAm. Acido Ribonucleico mensajero.  
SDF-1 (CXCL12). Factor 1 derivado del estroma.  
SH. Suero Humano.  
SN. Sobrenadante.  
Th<sub>1</sub>. Linfocito T cooperador 1.  
Th<sub>17</sub>. Linfocito T cooperador 17.  
Tip-DC. Célula dendrítica productora de iNOS y TNF- $\alpha$ .  
TLR. Receptor tipo Toll.  
TNF- $\alpha$ . Factor de necrosis tumoral alfa.  
UIMEA. Unidad de investigación medica en enfermedades autoinmunes.  
VEFG. Factor de crecimiento endotelial vascular.

## RESUMEN

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica con manifestación cutánea en la que las células dendríticas (DCs) han sido propuestas como mediadores clave en el desarrollo de la enfermedad. En la piel existen distintas sub-poblaciones de DCs, sin embargo, se ha propuesto que en pacientes con psoriasis puede existir una redistribución de poblaciones de DCs presentes en la sangre periférica (SP) a la piel para su participación en la formación de las placas psoriáticas. En la SP de sujetos sanos se han descrito dos poblaciones de DCs, las convencionales (cDCs) y las plasmacitoides (pDCs). En la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes (UIMEA) se identificó en la SP de individuos sanos una tercera población linaje negativa, que después de activarse muestra características compartidas de cDCs y pDCs. Esta población, que se denominó como “nDC” expresa marcadores de “homing” a piel y se encontró disminuida en la SP de pacientes con psoriasis sugiriendo su posible movilización a la piel. En este trabajo se evaluó el potencial de migración de las distintas poblaciones de células linaje negativas (LIN-) presentes en la SP de individuos sanos en respuesta a la quimiocina SDF-1 y a estímulos quimiotácticos presentes en sobrenadantes (SN) de cultivo de dermis de piel de pacientes con psoriasis activa. Los resultados muestran que las nDCs y las pDCs se movilizan en respuesta a la quimiocina SDF-1 y mostraron una mayor movilidad en respuesta a SN de pacientes con psoriasis, en comparación con SN controles. Las cDCs mostraron una pobre movilización en respuesta a SDF-1 y no mostraron diferencias en respuesta a los SN de pacientes y controles. Estos resultados muestran el potencial de movilización de las poblaciones de nDCs y pDCs en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes en piel inflamada y proponen a la quimiocina SDF-1 como un candidato para mediar dicha movilización.

## 1. INTRODUCCIÓN

La psoriasis es una enfermedad dermatológica idiopática caracterizada por hiperproliferación con prematura maduración de queratinocitos y retención del núcleo en el estrato corneo (paraqueratosis)<sup>1</sup>. En México se estima que afecta al 0.5% de la población y se encuentra dentro de las primeras 15 causas de consulta en los servicios de dermatología. Se presenta en igual proporción en hombres que en mujeres y por lo general se presenta en personas mayores de 40 años, aunque también existen los casos donde se presenta por debajo de los 30 años. Las manifestaciones clínicas son a nivel de piel, con predilección por algunas áreas como codos, rodillas y cuero cabelludo<sup>2</sup>. Las lesiones se caracterizan por ser placas bien delimitadas con descamación, induración, eritema debido al aumento de capilares e infiltrados celulares<sup>1</sup>.

Existen diversas manifestaciones clínicas de la psoriasis (psoriasis vulgar, gutate, pustulosa, artrítica, inversa, ungueal distrófica) que difieren en el área de presentación<sup>3</sup>, en algunas también varía la edad de manifestación pero la mayoría de los investigadores refieren que la forma mas común es la psoriasis vulgar, la cual afecta entre 85 y 90% de todos los pacientes que presentan esta enfermedad<sup>4</sup>.

La etiología de la psoriasis aun sigue siendo desconocida, pero existen trabajos que proponen la participación de componentes genéticos, ambientales e inmunológicos<sup>5</sup>.

La evidencia genética revela que las principales células que se ven afectadas en la psoriasis son los queratinocitos y diversos tipos de leucocitos mononucleares presentes en la piel (células dendríticas, linfocitos T y macrófagos). Se estima que hay una expresión alterada de alrededor de 1300 genes en las lesiones psoriáticas<sup>6</sup>. Hasta el momento se han encontrado 9 loci relacionados con psoriasis, llamados loci de susceptibilidad a psoriasis o *PSORS* (que incluyen del

1 al 9). El mayor determinante en psoriasis es *PSORS1*, el cual está localizado en la región del MHC dentro del cromosoma 6p21 y que contiene 3 genes fuertemente asociados con psoriasis vulgar<sup>7</sup>. Adicionalmente, se han realizado estudios del genoma donde se han observado alteraciones, por ejemplo a nivel de receptor, como es el caso del receptor de interleucina 23 (IL-23R) o bien por la no traducción de la región del gen p40 que codifica para la interleucina 12B (IL-12B)<sup>8,9</sup>. Asimismo alteraciones en las rutas de señalización en la diferenciación de los queratinocitos<sup>10</sup> y la señalización de NF- $\kappa$ B<sup>11</sup>, han sido indicadores de riesgo para presentar psoriasis.

Dentro de la participación del sistema inmune, fuertes evidencias demuestran que tanto la respuesta inmune innata (células dendríticas) y la respuesta inmune adaptativa, principalmente linfocitos T (LT), son cruciales para el establecimiento y desarrollo de la psoriasis<sup>3</sup>.

Desde años atrás se observó que el SI estaba involucrado en la patogenia de la enfermedad. Por ejemplo, en los años 70's hubo trabajos que mostraron que en piel de pacientes con psoriasis se encontraban una gran cantidad de células del sistema inmune<sup>12</sup>, en especial de células dendríticas y linfocitos T.<sup>13,14</sup>

Uno de los mecanismos por los cuales se presenta y evoluciona la psoriasis es un desequilibrio entre la activación de sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo<sup>1</sup>. Los queratinocitos, que son parte del SI innato, expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR), en específico, los receptores tipo toll (TLR) del 1 - 6 y el 9<sup>15</sup>; y en caso de psoriasis se encuentran sobre-expresados los TLR 1, 2, 5 y 9<sup>16,17</sup>. Por otra parte, los queratinocitos producen péptidos antimicrobianos catiónicos como catelicidina (LL-37)<sup>18,19</sup>, que tiene propiedades antibacterianas<sup>20</sup>, antifúngicas<sup>21</sup> y antivirales<sup>22</sup>.  $\beta$ -defensinas humanas 1, 2 y 3 (HBD1, HBD2 y HBD3) que actúan en contra de bacterias gram positivas (HBD3) y gram negativas (HBD2)<sup>5</sup> y proteínas de unión a calcio, conocidas como S100, que provocan la permeabilización de la membrana bacteriana. Cabe resaltar que un

miembro de esta familia; la psoriasina (S100A7), se encuentra incrementada en psoriasis.<sup>5,18</sup>

En adición a los péptidos antimicrobianos, los queratinocitos constitutivamente secretan diversas citocinas como son IL-1 $\alpha$ , factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-6<sup>23</sup>, las cuales en condiciones de inflamación crónica, como la psoriasis, son capaces activar a las células dendríticas dermales y estas a su vez, activar a los linfocitos T<sup>24</sup>.

En la etapa de progresión de la lesión, los linfocitos Th<sub>1</sub> y Th<sub>17</sub> una vez activados, producen citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL17A e IL-22, las cuales afectan a los queratinocitos, favoreciendo su proliferación y estimulando la secreción de péptidos antimicrobianos así como de citocinas pro-inflamatorias, con lo cual se mantiene y se amplifica el proceso de inflamación<sup>33,73,81,82</sup>

Las células dendríticas (DCs) son las células del sistema inmune derivadas de médula ósea con diversas funciones<sup>25</sup>. Las DCs son un puente de enlace entre la inmunidad innata y la adaptativa ya que son fundamentales en el inicio de una respuesta inmune (RI) mediada por linfocitos T. En su estado inmaduro las DCs son especialistas en la detección, captura y procesamiento de antígenos (Ag). Después de madurar adquieren la capacidad de presentar moléculas a los linfocitos T (LT)<sup>5</sup>. Las DCs participan además en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica hacia antígenos propios o inocuos<sup>26</sup>. Las DCs están distribuidas ampliamente dentro del cuerpo humano, en sangre periférica circulan mostrando un fenotipo basal o de reposo y una vez activadas migran hacia los órganos linfoides para iniciar una respuesta inmune<sup>25</sup>.

En SP, se han descrito ampliamente dos poblaciones de DC, las células dendríticas mieloides, hoy mejor conocidas como convencionales (cDC) y las células dendríticas plasmacitoides (pDC)<sup>26</sup>. Ambas poblaciones carecen de marcadores que indiquen pertenecer a un linaje de linfocito T (CD3), linfocito B (CD19), monocito (CD14) y asesinas naturales (CD56). Las cDC expresan las moléculas CD11c y HLA-DR, además tienen la capacidad de producir citocinas

pro-inflamatorias, mientras que las pDC expresan HLA-DR, CD123 y bajos niveles de CD11c y se caracterizan por ser células productoras de interferones tipo 1.

Dentro de la piel en condiciones de homeostasis (ausencia de inflamación) existen tres subpoblaciones de DCs. Las células de Langerhans (CL) se encuentran inmersas en la epidermis y dentro de sus funciones están la detección, captura, procesamiento y presentación de antígenos a linfocitos T efectores (LT<sub>efe</sub>)<sup>27</sup>.

Las células dendríticas dermales (dDC) se encuentran en la dermis y difieren de las CL tanto en la expresión de moléculas como en funciones. La última población, las pDC se encuentran de manera normal en la piel, en números bajos, pero diversos trabajos muestran que bajo condiciones inflamatorias, los números de estas se incrementan, por ejemplo; en psoriasis<sup>28</sup>.

Se ha observado que las pDC participan de manera importante en la patogénesis de la psoriasis, sobre todo en etapas tempranas debido a que son capaces de activar a las células dendríticas dermales, ya que pueden reconocer péptidos antimicrobianos acoplados a DNA endógeno<sup>29</sup>, provocando su activación y producción de interferones tipo 1.

Por otro lado, aunque la evidencia experimental es muy poca, se propone que bajo condiciones inflamatorias las DC presentes en la SP, pueden migrar a la periferia y formar parte del fenómeno inflamatorio local.

Lo anterior deja en evidencia que las DCs juegan un papel importante en el inicio y mantenimiento de la psoriasis. Sin embargo, se desconoce el origen de las DCs que se encuentran presentes en las lesiones psoriáticas, por lo tanto en este trabajo se evaluó el potencial de movilización de las distintas poblaciones linaje negativas presentes en la sangre periférica de individuos sanos ante estímulos quimiotácticos presentes en piel de pacientes con psoriasis para determinar si la SP podría ser una fuente de DCs o precursores que pudieran re-distribuirse a la piel en condiciones de inflamación.

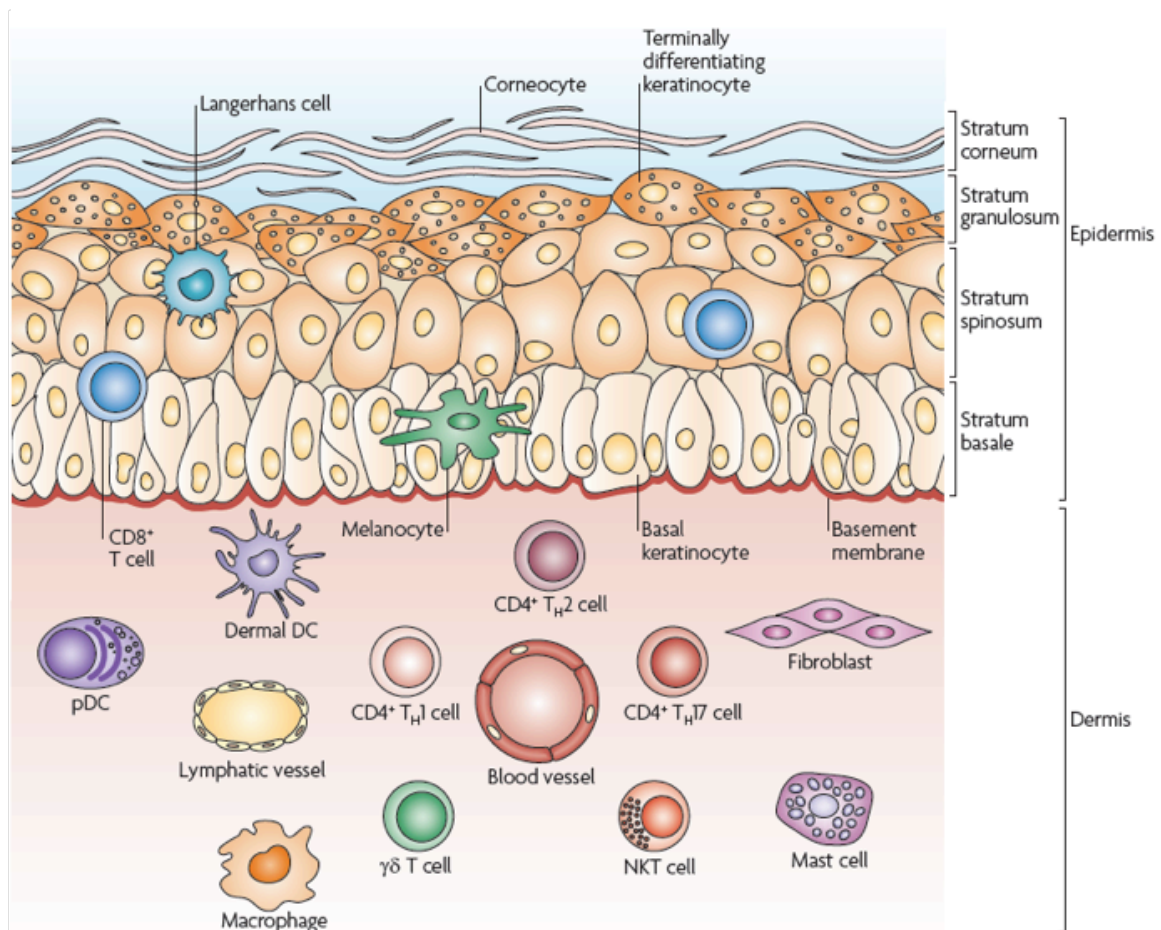
## 2. ANTECEDENTES

### ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DE LA PIEL

La piel es el órgano mas grande del cuerpo humano, es la primera barrera entre el cuerpo y el ambiente. Dentro de sus funciones están el mantenimiento de la temperatura corporal ya que funciona como aislante térmico. Protege algunos órganos de traumas o golpes y es la primera barrera de defensa contra patógenos<sup>30</sup>.

Se desarrolla a partir del ectodermo, esta compuesta por dos capas, la epidermis y la dermis. La epidermis es la capa más superficial de la piel, se le considera un epitelio poliestratificado que consta de 4 capas<sup>30</sup> (estrato basal, espinoso, granuloso y corneo). El estrato basal es la primera capa encargada de la regeneración de las células de la epidermis. Esta conformada por los queratinocitos, los cuales forman una barrera efectiva en contra de material extraño y agentes infecciosos, y que además minimizan la perdida de humedad<sup>31</sup>. Los queratinocitos están en constante diferenciación para dar origen a la siguiente capa; el estrato espinoso . En el estrato espinoso comienza la maduración de los queratinocitos y continua en la siguiente capa; el estrato granuloso donde cambian su forma columnar por poligonal y comienzan la síntesis de queratinas. Finalmente llegan al estrato corneo terminando su maduración. Esta ultima capa es la responsable de las propiedades de barrera de la piel debido a la presencia de los corneocitos, los cuales son células derivadas de la muerte de los queratinocitos y cuya característica principal es la ausencia de organelos, funcionando como barrera contra muchos agentes tóxicos y previniendo la deshidratación<sup>32</sup>. Por otra parte, se encuentran células más especializadas dentro de la epidermis como los melanocitos, encargados de la producción de melanina, que funciona protegiendo de la radiación. Otras células que se encuentran en la epidermis son las células de Langerhans, las cuales son una sub-población de DCs que están esparcidas dentro de la epidermis y cuya función principal es la detección, captura y presentación de antígenos. También se pueden encontrar en el estrato basal y estrato espinoso linfocitos T principalmente CD8<sup>+</sup> <sup>33</sup>.

La dermis es la capa interna de la piel, la cual funciona como estructura de soporte. Esta compuesta principalmente de fibras de colágena, elastina y sustancia fundamental, la cual esta constituida por mucopolisacáridos, ácido hialurónico y condroitin sulfato<sup>30</sup>. También esta conectada tanto a vasos sanguíneos como a vasos linfáticos. Las células que forman parte de ella son fibroblastos, los cuales sintetizan fibras de tejido conectivo y células del sistema inmune, principalmente LT, macrófagos, células dendríticas dermales y mastocitos mejor conocidos como células cebadas<sup>33</sup>.



**Figura 1. Capas y células que conforman la piel.** En la imagen se muestran las dos capas de la piel. La epidermis esta formada por los queratinocitos, los cuales maduran a lo largo de la epidermis formando los 4 estratos. Además se compone de células más especializadas como los melanocitos, células de Langerhans y linfocitos T CD8<sup>+</sup>. La dermis esta formada por fibras elásticas, vasos sanguíneos y linfáticos. Contiene fibroblastos y principalmente células del sistema inmune como son linfocitos T, células dendríticas dermales y plasmacitoides, células cebadas y células asesinas naturales T. Nestle *et al.* 2009



## **LA PIEL COMO PARTE DEL SISTEMA INMUNE**

Antes de los descubrimientos relativamente recientes acerca de las defensas inmunológicas en la piel, esta solo se consideraba una barrera con el ambiente, sin embargo al paso del tiempo se ha determinado su participación activa en el sistema de inmunovigilancia<sup>34</sup> que involucra además la participación en el mantenimiento de la homeostasis del tejido. Esta función se hace evidente cuando la respuesta del sistema inmune esta limitada o comprometida presentándose patologías cutáneas e infecciones recurrentes en la piel, por ejemplo en pacientes con SIDA<sup>35</sup> o sujetos que han sido sometidos a un trasplante<sup>36</sup>.

Por otra parte, las respuestas inmunes generadas en la piel son iniciadas y ejecutadas por células y moléculas tanto del sistema inmune innato como del sistema inmune adaptativo. La respuesta inmune innata es rápida, tiene poca discriminación y no presenta memoria. En contraste, la respuesta inmune adaptativa es altamente específica y es capaz de inducir memoria pero necesita un cierto tiempo para generarse. Los componentes en la piel del sistema inmune innato comprenden mecanismos inmediatos incluyendo las barreras físicas y los factores solubles como péptidos antimicrobianos, citocinas y quimiocinas producidas por queratinocitos, fibroblastos, células dendríticas y células polimorfonucleares (PMN); mientras que los componentes del sistema inmune adaptativo también incluyen citocinas y quimiocinas que son expresadas por los linfocitos T efectores<sup>34</sup>.

## **CÉLULAS DENDRÍTICAS**

### **Funciones y clasificación.**

Las DCs son células derivadas de precursores de medula ósea<sup>25</sup>. A pesar de múltiples investigaciones a la fecha no se conoce un precursor único para las DCs y estas pueden generarse a partir de precursores mieloides y linfoides comunes. Se sabe además que algunas sub-poblaciones como las CL pueden generarse a

partir de monocitos. Las DCs que se identifican en los tejidos en condiciones de inflamación (iDC)<sup>37</sup> se generan también a partir de monocitos.

La función principal de las DCs es el reconocimiento, captura, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T, de hecho las DCs son células presentadoras de antígeno profesionales (CPA) debido a que después de ser activadas expresan moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86)<sup>38</sup>, las cuales son cruciales para llevar de manera adecuada la activación de LT y la subsecuente activación de linfocitos B vírgenes. Otra función en la que participan las DCs es en el mantenimiento de la tolerancia periférica, ya que en condiciones de reposo o en presencia de estímulos tolerogénicos las DCs favorecen la eliminación de los linfocitos T autorreactivos por apoptosis, inducción de anergia o favoreciendo diferenciación de linfocitos T reguladores ( $T_{regs}$ )<sup>39</sup>. Estos mecanismos son importantes, en epitelios, por ejemplo, en el intestino, en donde las DCs CD103<sup>+</sup>, toman antígenos intestinales y migran hacia los ganglios linfáticos. Una vez allí, presentan los Ag y secretan moléculas como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), y productos relacionados al ácido retinoico que inducen a células T vírgenes a diferenciarse en  $T_{regs}$  Foxp3<sup>+</sup> <sup>40</sup>.

Las DCs pueden clasificarse de acuerdo a su origen, función y localización anatómica. En el cuerpo humano las DCs están presentes en los distintos tejidos periféricos como la piel, tejidos linfoides y en la sangre periférica (SP).

### **Células dendríticas en sangre periférica.**

Al igual que en los otros sitios anatómicos en la sangre periférica existen distintas sub-poblaciones de DCs que se caracterizan por la expresión diferencial de marcadores de superficie los cuales pueden indicar el grado de activación y diferenciación así como a determinar su posible linaje. En la SP de individuos sanos, existen dos poblaciones las cuales han sido descritas y estudiadas de manera muy amplia, las células dendríticas mieloides, ahora a llamadas convencionales (cDC) porque pueden ser originadas tanto de precursores

mieloides o linfoides y las células dendríticas plasmacitoides (pDC)<sup>26,41</sup>.

La identificación de las DCs de sangre periférica se realiza mediante la detección de una serie de moléculas expresadas en su superficie. El primer criterio para identificar sub-poblaciones de DCs en SP es la ausencia de marcadores que indiquen un compromiso con un linaje celular, como son CD3 (linfocitos T), CD14 (monocito), CD19 (linfocito B) y CD56 (asesina natural). Posteriormente, se utiliza la combinación de HLA-DR, CD11c y CD123 lo que permite identificar a las pDC y cDC. Las cDC son LIN<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> y CD123<sup>baja/neg</sup>, mientras que las pDC son LIN<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> y CD123<sup>Alto</sup>.

A pesar de las diferencias fenotípicas, las DCs de SP comparten algunas características funcionales tales como el reconocimiento de patógenos. Este reconocimiento lo llevan a cabo por la expresión de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) incluyendo los receptores tipo toll (TLR)<sup>42,43</sup>, los receptores de superficie lectinas tipo C (CLR)<sup>44</sup> y los receptores intracelulares tipo NOD (NLR)<sup>45</sup>.

### **Células dendríticas convencionales (cDC)**

En trabajos recientes se ha propuesto, que dentro de la población de cDCs existen tres sub-poblaciones de DCs debido a la expresión diferencial de moléculas como CD16, CD11b/c y los denominados BDCAs<sup>46</sup> (Blood dendritic cell antigens). Dentro de las CD16<sup>+</sup> podemos encontrar una población que expresa el marcador M-DC8<sup>+</sup><sup>47</sup>. En SP las cDC constituyen del 0.5% al 1% del total de las células mononucleares en circulación<sup>48</sup>. Las cDCs en SP, en estado basal o de reposo, expresan niveles basales de moléculas co-estimuladoras y se considera que su función principal es la de detectar, capturar y presentar a antígenos. Estas DCs han sido denominadas también como pre-DCs capaces de activarse y diferenciarse a DCs maduras. A la fecha se desconoce si las cDCs de SP viajan continuamente a los órganos linfoides como pre-DCs o DCs inmaduras, o si esta característica la adquieren después de ser activadas o diferenciadas

terminalmente. Una vez en los órganos linfoides secundarios la principal función de estas células en estado inmaduro es inducir tolerancia inmunológica y en estado maduro activar a los linfocitos T vírgenes y así iniciar una RI<sup>49,50</sup>. Además son células con una alta capacidad de producir citocinas en respuesta a infecciones bacterianas o virales, citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-12, la cual dirige hacia una respuesta Th<sub>1</sub><sup>49</sup>. Diversos estímulos son capaces de activar a las DCs, por ejemplo: bacterias o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), ya que cuentan con receptores de reconocimiento de patrones (PRR), entre los que incluye a los TLR, los cuales en estado inmaduro expresa TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10<sup>51</sup>, aunque en mayor nivel el TLR 1, 2 y 3. A la fecha se desconoce si estas células podrían además de viajar a los órganos linfoides, viajar como DCs inmaduras o precursores después de ser activadas a tejidos periféricos.

### **Células dendríticas convencionales M-DC8<sup>+</sup>**

Esta población también llamada slanDCs, se caracteriza por la expresión de la molécula M-DC8 o 6-sulfoLacNAc, la cual es una modificación al carbohidrato del ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL1)<sup>52</sup>. Estas células carecen del antígeno leucocitario cutáneo (CLA) y son incapaces de unirse a P y E selectina. CLA es una molécula importante en favorecer la movilización celular, es un carbohidrato perteneciente a la familia de las selectinas y confiere tropismo hacia piel en aquellas células que lo expresan (linfocitos T, monocitos, neutrófilos y DCs). Estas células también expresan receptores de anafilatoxinas como son C5aR y C3aR, los cuales están implicados en el reclutamiento de células hacia los sitios de inflamación. También expresan CD16 que es el receptor de baja afinidad para IgG (Fc $\gamma$ III). Como parte de sus características funcionales, se ha observado que las cDC M-DC8<sup>+</sup> son productoras de altas cantidades de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ <sup>53</sup> en respuesta a lipopolisacárido (LPS).

En trabajos recientes se propuso que las slanDCs pudieran estar implicadas en la patogénia de la psoriasis, debido a que en lesiones psoriáticas fueron detectadas células que expresan este marcador. Estas células expresaron además la sintasa

de óxido nítrico inducible (iNOS) y mostraron ser capaces de responder a complejos del péptido antimicrobiano LL37 - RNA, mecanismo clave en el inicio de la psoriasis<sup>54</sup>. Por otra parte, slanDCs aisladas de SP produjeron cantidades considerables de IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-12, e IL-6. Además fueron productoras de citocinas como IL-22, IL-23, que son inductoras de respuestas tipo Th<sub>17</sub>, mientras que TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , favorecen una respuesta tipo Th<sub>1</sub>, ambas respuestas se ha propuesto están implicadas en el mecanismo inmunológico que genera las lesiones en psoriasis. Estas evidencias proponen que las slanDCs de la SP pudieran re-distribuirse a la piel y participar en la patogénesis psoriasis y quizá otros padecimientos inflamatorios crónicos en la piel.

### **Células dendríticas plasmacitoides (pDC)**

Las pDCs a diferencia de las cDCs tienen una elevada expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de interleucina 3 (IL-3). En un principio la expresión de CD123 permitió su caracterización<sup>55</sup> y posteriormente se observó que la cadena  $\alpha$  esta acoplada con la subunidad  $\beta$  para formar el receptor IL-3, la cual es importante para el desarrollo y supervivencia de las pDC<sup>56</sup>. Además expresan en su superficie las moléculas BDCA-2 y BDCA-4. Las pDC son células poco frecuentes, se estima que representan menos del 0.3% del total de células mononucleares que están en circulación<sup>48</sup>. Su nombre se debe a que, en estado de reposo, se asemejan a las células plasmáticas<sup>28</sup>. Sin embargo, después de activarse adquieren morfología dendrítica. Una característica importante de las pDCs es la rápida y elevada cantidad de producción de IFN- tipo 1, principalmente IFN- $\alpha$ <sup>57,58</sup>, en respuesta a agentes virales. Las pDC no necesitan estar infectadas ya que pueden detectar componentes virales como RNA de doble cadena o DNA rico en CpG no metilado, ya que expresan tanto TLR-7 y TLR-9<sup>59</sup>. Al secretar interferones Tipo-1, las pDC pueden activar por una parte a células del sistema inmune innato (asesinas naturales y cDC) y también a células del sistema inmune adaptativo (linfocitos T). Las pDCs después de activarse incrementan la expresión tanto de moléculas co-estimuladoras como de MHC clase II, una vez maduras, las pDC tiene un papel importante en la presentación de Ag y activación de las células T<sup>60</sup>.

Las pDC se puede dividir en dos subpoblaciones, que se caracterizan por la expresión diferencial de CD2, sin embargo, ambas expresan IFN-  $\alpha$ , granzima B y TRAIL, aunque las CD2<sup>altas</sup> son mejores inductoras de la proliferación de LT<sup>61</sup>. Se ha propuesto que las pDC participan de manera importante en la patogenia de la psoriasis, sobre todo en etapas tempranas debido a que son capaces de activar a las células dendríticas dermales, ya que pueden reconocer péptidos antimicrobianos acoplados a DNA endógeno<sup>29</sup>, provocando su activación y producción de interferones tipo 1.

## **CELULAS DENDRITICAS EN PIEL**

En condiciones de homeostasis (ausencia de infección), en la piel existen diversas sub-poblaciones de DC. Se clasifican en epidermales y dermales (dDCs), participando de manera activa tanto en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica así como en el inicio de una respuesta inmune, de esta manera se ha propuesto que participan además mediando estados de pérdida de tolerancia y de inflamación crónica en la piel.

### **Células dendríticas epidermales**

Estas células, mejor conocidas como células de Langerhans (CL) son la única población de DCs presentes en la epidermis, residiendo en las capas suprabasales, intercaladas entre los queratinocitos, a pesar de que abarcan una área importante de la piel representan del 2-4% del total de células epidermales<sup>62</sup>. Fenotípicamente, las CL expresan CD207 (langerina), un receptor de la familia de las lectinas tipo-C; CD1a y HLA-DR. Morfológicamente, las CL poseen una estructura citosólica característica, los gránulos de Birbeck<sup>62</sup>, que asemejan la forma de una raqueta de tenis. La langerina esta asociada a estos gránulos y se propone que la captura de patógenos que contienen manosa en su membrana es dependiente de esta proteína. Además responden a los ligandos de TLR 2, 7 y 8, produciendo IL-8, IL-12 y TNF-  $\alpha$ <sup>63</sup>. Algunos trabajos sugieren que las CL son capaces de responder a poli I:C que es un ligando de TLR-3<sup>64</sup>. Las CL son las

principales células de la epidermis implicadas en la captura de patógenos, procesando, madurando y migrando a los nódulos linfáticos drenantes para estimular a los linfocitos T a través de la presentación de Ag por medio de HLA-DR<sup>27,65</sup>.

### **Células dendríticas dermales**

En la dermis en condiciones de homeostasis, se encuentran dos poblaciones de células dendríticas de origen mielóide denominadas como DCs dermales (dDC). La primera se caracteriza por la expresión de CD1b, CD1c (BDCA1), CD11c, CD36, CD205, HLA-DR y la subunidad A de la proenzima Factor XIII de la coagulación<sup>66</sup>. Recientemente se describió una segunda población que en lugar de expresar BDCA1 expresa CD141 (BDCA 3)<sup>67</sup>. Las dDC en un estado inmaduro o de reposo expresan TLR 2, 4, 6, además de CD206 y CD209 (DC-SIGN) y al madurar aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) así como CD83 pero disminuyen la expresión de sus TLR<sup>68</sup>. En cuanto a su función, diversos ensayos revelaron que las dDC, comparten con los macrófagos la capacidad de fagocitar pero además tienen una alta eficiencia de fagocitosis, así como capacidad para presentar Ag, migrar de la piel hacia los nódulos linfáticos drenantes y activar a los LT. Por otra parte, se propone que las dDC tiene un papel dentro de la patogénesis de distintas enfermedades inflamatorias cutáneas. En la etapa de inicio de la psoriasis, las subpoblaciones de DCs que residen en la piel son las principales células implicadas en el origen de la lesión psoriática. Debido a factores ambientales, infecciones bacterianas, el estrés, fármacos (beta bloqueadores, litio), alguna mutación en el locus PSORS1 o en IL-23R, se genera un daño en los queratinocitos y liberan su contenido, incluido LL-37 y DNA endógeno, formando un complejo que es reconocido por CL o pDC a través de TLR<sup>29,69</sup>, activándose, produciendo interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )<sup>70</sup> que actúa en las dDC activándolas. Estas viajan al nódulo linfático drenante de la piel, donde presentan antígenos, aun desconocidos y producen IL-23 e IL-12<sup>71</sup> induciendo una respuesta Th<sub>1</sub> o Th<sub>17</sub>, la cual está implicada en la proliferación excesiva de la epidermis.

## **Células dendríticas inflamatorias dermales**

Aunque su origen no es muy claro, las células dendríticas inflamatorias (iDCs) que se han identificado en la dermis de pacientes con psoriasis podrían representar una subpoblación de las dDC “no residentes” de la piel ya que además de expresar marcadores de superficie distintos a los de las dDCs residentes de la piel, las iDCs identificadas en pacientes con psoriasis expresan CD11c pero son negativas a BDCA-1 y BDCA-3. Por otra parte los números de DCs con características inflamatorias se incrementan en condiciones de inflamación, el número de iDCs CD11c<sup>+</sup> es 30 veces mayor en las placas psoriáticas en comparación con individuos sanos<sup>72</sup> esto sugiere su reclutamiento de otro sitio a la piel. Una posible fuente de iDCs es la SP. Dentro de las iDCs existe una subpoblación que se caracteriza por la alta producción de citocinas pro-inflamatorias incluyendo TNF-  $\alpha$  así como la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), esta población ha sido denominada TIP-DC<sup>73</sup>. Trabajos hechos acerca de las TIP-DC muestran que estas células se encuentran infiltrando dermis y epidermis de lesiones psoriáticas, teniendo un efecto pro-inflamatorio debido a la producción de TNF- $\alpha$  e iNOS<sup>74</sup>. Recientemente se propuso que la fuente de iDCs podrían ser las SLanDCs o M-DC8<sup>+</sup> DCs de la sangre periférica, las cuales producen en grandes cantidades citocinas pro-inflamatorias como TNF-  $\alpha$ , IL-6, IL1 $\beta$ . Debido a que células positivas para el marcador M-DC8<sup>+</sup> fueron encontradas en lesiones de pacientes con psoriasis, se pensó que las SLAN DC pudieran re-distribuirse de la SP a la piel para participar en la patogenia de esta enfermedad<sup>54</sup>.

## **Células dendríticas plasmacitoides**

Existe controversia acerca de la presencia de las pDC en piel sana, algunos autores afirman que en piel normal están ausentes<sup>68</sup>, otros opinan que si están presentes pero en bajas frecuencias<sup>75</sup>. El punto donde si hay acuerdo es que las pDC están incrementadas en piel lesionada de diversas patologías con manifestación cutánea<sup>76</sup>, el lupus eritematoso cutáneo en sus distintas variedades,



la dermatitis atópica y la psoriasis. Se ha propuesto que las pDC participan en etapas tempranas de la formación de las placas psoriáticas ya que reconocen complejos proteína-DNA/RNA a través de TLR-7 y 9. Esto trae como consecuencia su activación y producción de grandes cantidades de IFN- $\alpha$ , el cual puede activar a las dDC<sup>77</sup>. Se ha propuesto también, sin que exista una evidencia sólida, que el número incrementado de pDCs presentes en las lesiones psoriáticas es consecuencia del reclutamiento de estas células de la SP a la piel.

## **QUIMIOTAXIS Y QUIMIOCINAS**

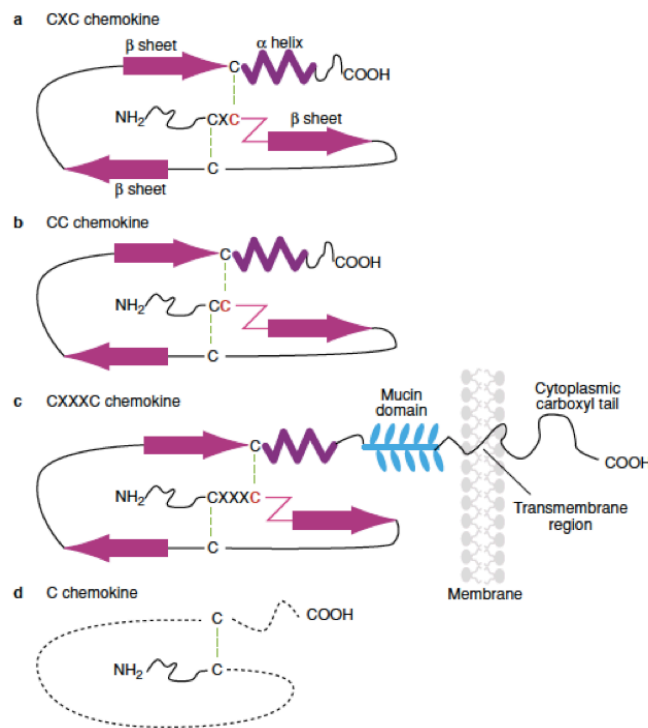
### **Quimiotaxis**

La quimiotaxis es el movimiento celular direccionado debido a un gradiente de concentración. El movimiento direccional requiere que la célula este polarizada; es decir, que componentes del citoesqueleto estén en dos polos de la célula, esta propiedad es intrínseca y puede surgir debido a señales direccionales. En parte, el movimiento necesita la polimerización de filamentos de actina en el frente de la células, causando el desplazamiento de la superficie hacia delante seguida de una contracción de la parte posterior de la célula a menudo mediado por la contracción de miosina II<sup>80</sup>.

### **Quimiocinas**

Las quimiocinas son citocinas que inducen la quimiotaxis. Estructuralmente son pequeñas proteínas con cuatro cisteínas conservadas formando dos puentes disulfuro (Cys1-Cys3, Cys2-Cys4), Tienen una región amino terminal corta precediendo el primer puente disulfuro, enseguida una serie de laminas  $\beta$ -plegadas; uniendo cada asa, se encuentran la segunda y cuarta cisteína, finalmente se encuentra la región carboxi-terminal conformada de 20-30 aminoácidos aproximadamente<sup>81</sup>. Las quimiocinas pueden ser divididas en dos grupos funcionales, linfoides e inflamatorias. Las linfoides se expresan constitutivamente y preferentemente en los órganos linfoides. Están implicadas en

el mantenimiento de la estructura del órgano linfoide además de la recirculación de LT vírgenes. Mientras que las inflamatorias están ausentes en condiciones normales pero están presentes en situaciones de daño celular, infecciones o en tumores, favoreciendo el reclutamiento celular<sup>82</sup>. La clasificación de las quimiocinas es de acuerdo a la disposición de las cisteínas conservadas añadiendo una L, haciendo referencia a que es el ligando de un receptor. Las quimiocinas del grupo CC (CCL1-CCL27) tienen la primera y la segunda cisteína adyacentes, mientras que el grupo CXC (CXCL1-CXCL15) la primera y la segunda cisteína están separada por un aminoácido. El tercer grupo CX<sub>3</sub>C (CX<sub>3</sub>CL1) indica la presencia de 3 aminoácidos entre la primera y la segunda cisteína. Por ultimo el grupo XC (XCL1, XCL2) indica que solo tiene 2 cisteínas (Cys2-Cys4) por lo tanto solo un puente disulfuro<sup>83</sup>.



**Figura 2. Representación esquemática de la estructura secundaria de las 4 familias de quimiocinas.** En cada uno de los grupos (a-d) se muestra que la región amino terminal precede a las primeras dos cisteínas. Después de la Cys marcada con rojo (conservada) se muestran una alfa hélice (línea rosa en "z") y tres beta plegadas antiparalelas (flechas en rosa). En las tres familias (a-c) después de la cuarta Cys hay una alfa hélice (línea purpura) y finalmente la región carboxi terminal. En c existe una extensión que incluye un dominio de mucina. La cuarta familia (d) se representa con líneas punteadas ya que no se conoce la estructura. Frederick *et al.* 2001.

Por otra parte, los receptores de quimiocinas pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acopladas a proteínas G heterodimericas, las cuales a través de una cascada de señalizaciones generan los cambios necesarios para permitir la quimiotaxis. Su clasificación es similar a la de las quimiocinas solo que en lugar de emplear L, se emplea R para hacer énfasis que se trata del receptor. Existen 18 receptores descritos, por lo tanto existe mas de una quimiocina que se une a un receptor, excepto en el caso de CXCR4 cuyo único ligando es CXCL12 (SDF-1)<sup>84,85</sup>.

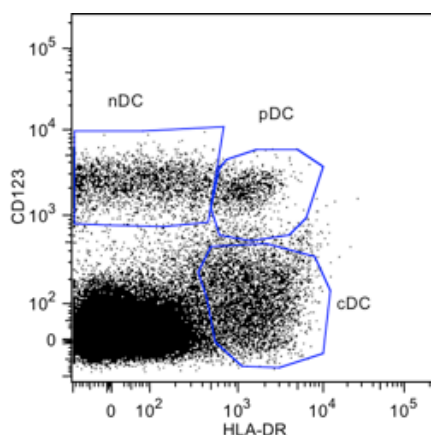
### **CXCR4 y CXCL12**

CXCR4 o CD184 fue descrito junto con CCR5, al funcionar como co-receptores para la entrada del HIV<sup>86</sup>. Este receptor se expresa en una gran cantidad de células como células endoteliales vasculares, neuronas, microglía, astrocitos, precursores linfoides y mieloides así como monocitos, macrófagos, linfocitos T , linfocitos B y DCs<sup>87</sup>. El ligando de CXCR4 es CXCL12 o factor derivado del estroma (SDF-1). Existen dos isoformas de SDF-1, SDF-1 $\alpha$  y SDF-1 $\beta$  generadas por el splicing alternativo del gene SDF-1, donde la isoforma SDF-1 $\alpha$  es la predominante<sup>88</sup>. SDF-1 esta implicada en diversos procesos fisiológicos, en la hematopoyesis<sup>88</sup>, especialmente la linfopoyesis de B<sup>87</sup>, en el desarrollo neuronal<sup>88</sup> y en la angiogénesis<sup>89</sup>.

Se sabe que los precursores de DCs en circulación expresan CCR3 y CXCR4<sup>80</sup>. Algunos trabajos han propuesto que las pDC expresan CXCR4 y que logran migrar hacia los nódulos linfáticos solo en respuesta a CXCL12<sup>90</sup>. Trabajos más recientes muestran que en DCs derivadas de medula ósea de ratón, CXCR4 es importante para la maduración y sobrevivencia de las DCs<sup>91</sup>. Este mismo grupo de trabajo, además mostro que CXCL12 era necesaria para la migración de DCs cutáneas hacia los nódulos linfáticos<sup>92</sup>. Los trabajos en humanos, muestran que en un modelo de contacto con alergen CXCL12 fue importante para la migración de CL activadas de la epidermis a la dermis<sup>93</sup>. Por otra parte, se observó que la población cDC M-DC8<sup>+</sup> aislada de SP tuvo las capacidad de movilizarse en respuesta a CXCL12<sup>54</sup>.

## ANTECEDENTES DIRECTOS AL TRABAJO

En un trabajo previo realizado en la UIMEA con un grupo de 30 pacientes con psoriasis y 30 controles se identificó en sangre periférica una población con fenotipo  $\text{LIN}^-$ ,  $\text{CD123}^+$  y  $\text{HLA-DR}^{\text{baja}}$  (**Figura 3**), la cual al ser aislada y cultivada in vitro en presencia de IL-3 presenta características de células dendríticas. A esta población se le denominó como “nDC”. Se determinó además que expresa el antígeno leucocitario cutáneo (CLA) y que se encontraba disminuida en la sangre periférica de los pacientes con psoriasis y que esta disminución correlacionaba con el índice de área y severidad en psoriasis (PASI).



**Figura 3. Subpoblaciones de DCs presentes en sangre periférica.** La gráfica de puntos muestra las 3 subpoblaciones presentes en SP que son: las células dendríticas convencionales (cDCs), células dendríticas plasmacitoides (pDCs) y las DCs caracterizadas en la UIMEA (nDCs).

Posteriormente se caracterizó fenotípica y funcionalmente a la población nDC. Hasta el momento el fenotipo evaluado de esta población es  $\text{LIN}^-$ ,  $\text{HLA-DR}^{\text{baja}}$ ,  $\text{CD11C}^{\text{baja}}$ ,  $\text{CD4}^-$ ,  $\text{CD8}^-$ ,  $\text{CD20}^-$ ,  $\text{BDCA-1}^{\text{baja}}$ ,  $\text{BDCA-2}^{\text{+/-}}$ ,  $\text{BDCA-3}^-$ ,  $\text{BDCA-4}^-$ ,  $\text{CD45RA}^-$ ,  $\text{CD45RO}^-$ ,  $\text{CD80}^{\text{baja}}$ ,  $\text{CD86}^{\text{baja}}$ ,  $\text{B7-H1}^{\text{+/-}}$ ,  $\text{CD11b}^+$ ,  $\text{CD62L}^+$ ,  $\text{CLA}^+$  y recientemente se encontró que expresa CXCR4. Además es positiva para el marcador CD13, lo que la pudiera relacionar con un linaje mieloide. Estos resultados junto con la disminución de esta población en sangre periférica de pacientes con psoriasis activa, sugieren que podría ser una población celular con potencial de migración a piel en condiciones de inflamación.

Por otra parte, a nivel de RNAm y proteína se observó que la población “nDC” expresa niveles basales de TLR-2, 4, 7 y 9 los cuales pueden incrementarse después del cultivo de esta población en presencia de IL-3. La morfología de la población nDC cambia notablemente después de ser cultivada en presencia de IL-3 y, en presencia de virus de influenza inactivado se observa la formación de agregados celulares. Además al ser incubadas bajo estas condiciones, la población de estudio incrementa ligeramente la expresión de HLA-DR y de la molécula CD40, pero no así de CD80, CD86. Tanto en condiciones basales como después de activación la población “nDC” expresa B7-H1 y B7-DC, moléculas co-inhibidoras y ligandos del receptor de muerte PD-1. La evidencia sugiere fuertemente que esta población celular en condiciones basales o reposo no participa en el proceso de presentación de antígenos a linfocitos para la inducción de una respuesta inmune pero posiblemente podría participar en la inducción de tolerancia inmunológica.

También se encontró que bajo estas mismas condiciones de cultivo, la población de interés produce importantes niveles de IL-8 y niveles bajos de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN tipo 1 en comparación con las otras subpoblaciones de DC presentes en la sangre periférica. En conjunto, estos resultados sugieren que la población “nDC” pudiera tener una capacidad migratoria ante estímulos presentes en la piel inflamada y que al expresar TLR-2, 4, 7 y 9 tenga la capacidad de ser activadas por virus, bacterias y quizá también por ligandos endógenos participando activamente en procesos inflamatorios cutáneos en la piel.

En otro trabajo realizado en la UIMEA, se asociaron las cDC directamente con la patogénesis de las lesiones cutáneas de lupus eritematoso diseminado (LED), principalmente a la subpoblación M-DC8<sup>+</sup>, al encontrarse disminuidas en la sangre periférica de los pacientes con LED activo y que, en etapas estables (sin lesiones activas ni manifestaciones clínicas) los números de estas células regresaban a la normalidad.

Finalmente en un trabajo previo realizado en la UIMEA se evaluó el potencial de migración de las distintas poblaciones de células linaje negativas presentes en la SP de individuos sanos ante estímulos quimiotácticos presentes en piel bajo condiciones de inflamación y se propusieron a la IL-8 y a SDF-1 como quimiocinas que pudieran participar en la movilización de estas poblaciones a la piel.

#### **4.JUSTIFICACION**

Los resultados obtenidos en la UIMEA que muestran que la población “nDC” se encuentra disminuida en la SP de los pacientes con psoriasis además de la elevada expresión de CLA y la movilidad observada en presencia de IL-8 sugieren que esta población pudiera tener un capacidad migratoria ante estímulos presentes en la piel inflamada y ser activada in situ por virus, bacterias y quizás también por ligandos endógenos a través de los TLRs para participar activamente en procesos inflamatorios cutáneos en la piel.

Por otro lado, existen evidencias que muestran la participación tanto de las pDC como de cDCs con características inflamatorias en la patogénia de la psoriasis. Por todo esto resulta de suma importancia evaluar la capacidad de movilización de las distintas poblaciones linaje negativas presentes en la SP de individuos sanos ante estímulos quimiotácticos presentes en sobrenadantes de cultivo de células de dermis de pacientes con psoriasis, así como evaluar el papel de la quimiocina SDF-1 en este proceso de movilización.

## 5. HIPOTESIS

- Las células linaje negativas presentes en la sangre periférica de individuos sanos tienen el potencial de migrar ante estímulos quimiotácticos expresados por células de dermis de piel lesionada de pacientes con psoriasis activa.

## 6. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el potencial de movilización de las células linaje negativas presentes en la sangre periférica de individuos sanos ante estímulos quimiotácticos expresados por células de la dermis de piel lesionada de pacientes con psoriasis activa.

### **Objetivos particulares.**

- Evaluar la presencia de las distintas poblaciones linaje negativas en la SP de pacientes con psoriasis con respecto a individuos control.
- Evaluar la expresión del receptor de la quimiocina SDF-1 (CXCR4) en las distintas poblaciones de células linaje negativas de individuos sanos y de pacientes con psoriasis.
- Determinar la presencia de la quimiocina SDF-1 en sobrenadantes de cultivos celulares de dermis de lesiones de pacientes con psoriasis activa.
- Evaluar el comportamiento migratorio de las distintas poblaciones linaje negativas presentes en la sangre periférica en respuesta a la quimiocina SDF-1.
- Comparar la migración inducida por los sobrenadantes de cultivos de células de dermis de piel lesionada de pacientes con psoriasis activa con la migración inducida por los sobrenadantes de cultivos de células de dermis de individuos sanos.
- Evaluar si la migración inducida por SN de pacientes con psoriasis es dependiente de la quimiocina SDF-1.

## 7. METODOLOGÍA

### **Materiales**

**Muestras de sangre periférica.** Las muestras de sangre periférica de pacientes con psoriasis fueron obtenidas por punción venosa. Mientras que la sangre de individuos sanos se tomo a partir de concentrados leucocitarios de donadores del banco central de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

**Obtención de biopsias de piel lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis debutantes, crónicos y controles sanos.** Las biopsias de piel fueron obtenidas de pacientes con psoriasis debutantes y crónicos que acuden al servicio de dermatología del hospital “Adolfo López Mateos” perteneciente al ISSSTE. Las biopsias fueron tomadas con sacabocados de 5mm de diámetro. Se tomo piel de una región lesionada y de piel no lesionada cercana a la lesión. Se pidió que 15 días antes de la toma de biopsia se suspendiera el tratamiento en aquellos pacientes que lo tuvieran. La piel sana fue obtenida a partir de individuos sometidos a cirugías gastrointestinales practicadas en el hospital de especialidades del CMN SXXI.

**Biopsias de pacientes y sanos en cultivo celular para la obtención de sobrenadantes de dermis.** La biopsia de piel lesionada y sin lesión se coloca en un tubo que contiene dispasa 1mg/mL (Proteasa grado II, Roche) y 2mL de RPMI 1640 (GIBCO Invitrogen) suplementado 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 (GIBCO Invitrogen) suplementado durante 72 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, para facilitar la salida de las células del tejido. Después se colectó el medio con dermis y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante recolectado y se congeló a -80°C. Al igual que los sobrenadantes las células se congelaron.



**Anticuerpos empleados para citometría de flujo.** Para evaluar la viabilidad de las células se utilizó Hoescht (Roche). Los anticuerpos empleados para LIN fueron CD3, CD14, CD19 (eBioscience) y CD56 (BD-Pharmingen) conjugados con PE. Para la identificación de las poblaciones de interés se emplearon CD123-PECy5, CLA-Biotina y Estreptavidina-PECy7 (BD Pharmingen), HLA-DR APC-H7 (BD biosciences), CXCR4-APC (Biolegend) y M-DC8-FITC (Miltenyi Biotec).

**Ensayo de migración.** Además de los sobrenadantes de dermis, se utilizó como control positivo SDF-1 subunidad- $\beta$  (Prepotech). Para el experimento de bloqueo se empleo el anticuerpo  $\alpha$ -CXCR4 (Biolegend). Se utilizó un sistema de Transwell. Cada transwell con dimensiones: diámetro; 6.5mm, tamaño de poro; 0.5  $\mu$ m (Corning) y colocados en placas de 24 pozos.

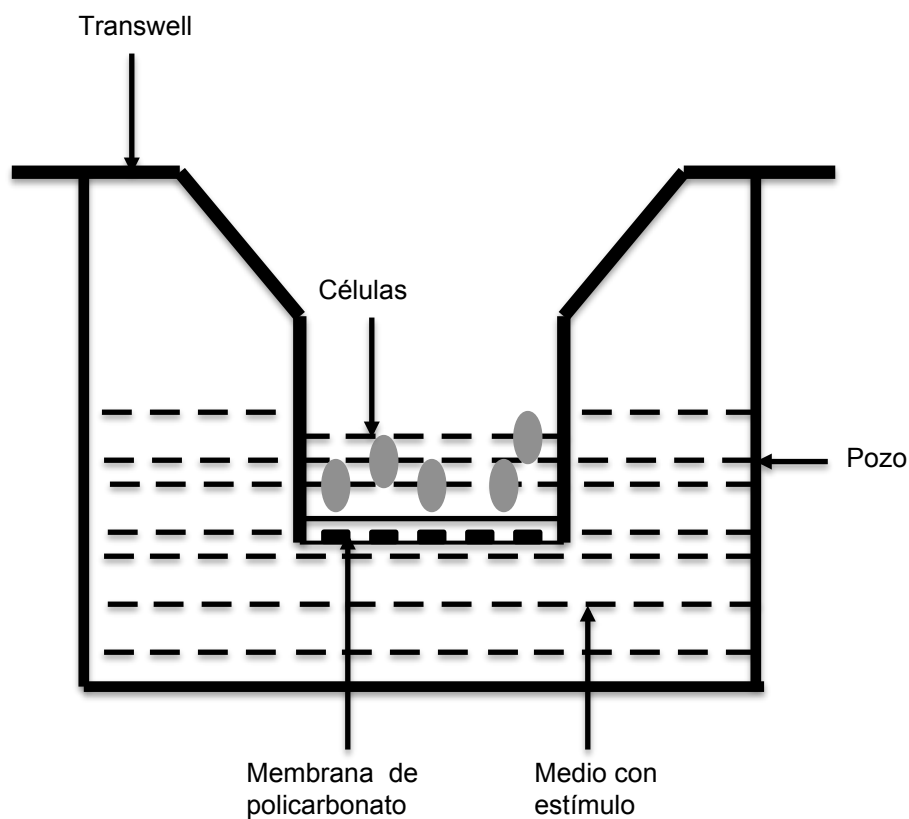
**Medio empleado para los ensayos de migración.** Se empleo medio RPMI 1640 con 10% suero humano (SH) (obtenido de individuos jóvenes sanos) y HEPES 0.25 mM (Hyclone).

## **Procedimientos**

**Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).** El concentrado leucocitario se diluyó 1:1 en PBS. Después esa dilución se colocó en ficoll para obtener las células mononucleares y se sometieron a centrifugación a 2000 rpm por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se colectaron las células y se lavaron con PBS 3 veces, a 1500 rpm durante 3 minutos, 700 rpm durante 10 minutos y 1500 rpm durante 10 minutos. Enseguida se resuspendió el botón celular en PBS y se contaron las células empleando azul tripano en una cámara de Neubauer.

**Ensayos de migración en sistema transwell.** La **Figura 4** muestra un esquema del sistema transwell utilizado. Los insertos transwell fueron colocados en placas de 24 pozos, cada pozo contenía 600  $\mu$ L de medio RPMI 10% SH solo, con SN de dermis de pacientes o con la quimiocina SDF-1. En cada transwell se colocaron 2

millones de PBMC suspendidas en 100  $\mu$ L de RPMI 10% SH. Después se colocó el transwell dentro del pozo que contenía el estímulo correspondiente y se dejó migrar las células durante 3 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo, se retiró cuidadosamente el transwell del pozo y se colectó el medio ya que contiene a las células migrantes y se realizaron lavados del pozo con RPMI 10% SH para recuperar aquellas células que pudieran haber quedado adheridas al mismo. El medio presente en el transwell también se recolectó ya que contiene a las células no migrantes. Tanto las células migrantes como las no migrantes se contaron utilizando azul tripano. Después del conteo, las células se colocaron en una placa de 96 pozos para su posterior tinción superficial.



**Figura 4. Sistema transwell.** Se muestra el sistema usado en los ensayos de migración. Se ilustra la parte superior (transwell) que contiene a las PBMC y la parte inferior (pozo) que contiene los diferentes estímulos quimiotácticos.

Debido a que algunas de las poblaciones de interés como las cDC o pDC no tienen tanta capacidad migratoria, se decidió colocar tres transwell por condición y en cada condición 2 millones de PBMC, por lo tanto se utilizaron 6 millones por condición. Las células migrantes de los tres pozos de la misma condición se combinaron para poder tener un número suficiente de células y poder realizar la lectura de la muestra en el citómetro de flujo.

**Ensayo de migración bloqueando CXCR4 en PBMC.** Después de tener en suspensión los dos millones de PBMC, se agregó  $\alpha$ -CXCR4 a una concentración de 50  $\mu$ g/mL y se dejó bloquear durante 15 minutos. Terminado el tiempo se colocó la suspensión celular en el transwell y se procedió a realizar el ensayo de migración, de acuerdo a lo descrito anteriormente.

**Tinción superficial de inmunofluorescencia.** Una vez colocada la suspensión celular en el pozo, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos después se incubaron las células con la mezcla de anticuerpos (LIN-PE, CD123-PECy5, CLA-Biotina, HLA-DR APCH7, CXCR4-APC y M-DC8-FITC) por 20 minutos a 4°C. Terminado el tiempo de incubación se hicieron 2 lavados y posteriormente se agregó al pozo la estreptavidina-PECy7 (la cual se une fuertemente a la biotina), se incubó por 20 minutos y de nueva cuenta se hicieron 2 lavados. Por último las células fueron fijadas con 50 $\mu$ L de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Pasado el tiempo se realizaron 2 lavados y finalmente el botón celular se resuspendió en 100 $\mu$ L de buffer de FACS para analizarlas por citometría de flujo. Todas las incubaciones se realizaron a 4°C y protegidas de la luz, mientras que todos los lavados se realizaron a 1500 rpm durante 3 minutos en buffer de FACS (PBS con 2% de suero de caballo).

**Cálculo de los números absolutos de las poblaciones de interés migrantes.** Después de la tinción, las células fueron leídas en un citómetro de flujo FACS Aria (BD-Bioscience) y los resultados se analizaron con el software FlowJo (Tree Star Inc.). Los números absolutos de las poblaciones de interés se calcularon mediante

una relación entre el número de células migrantes contadas y el porcentaje que representa la población de interés al hacer el análisis, como se expresa en la siguiente fórmula:

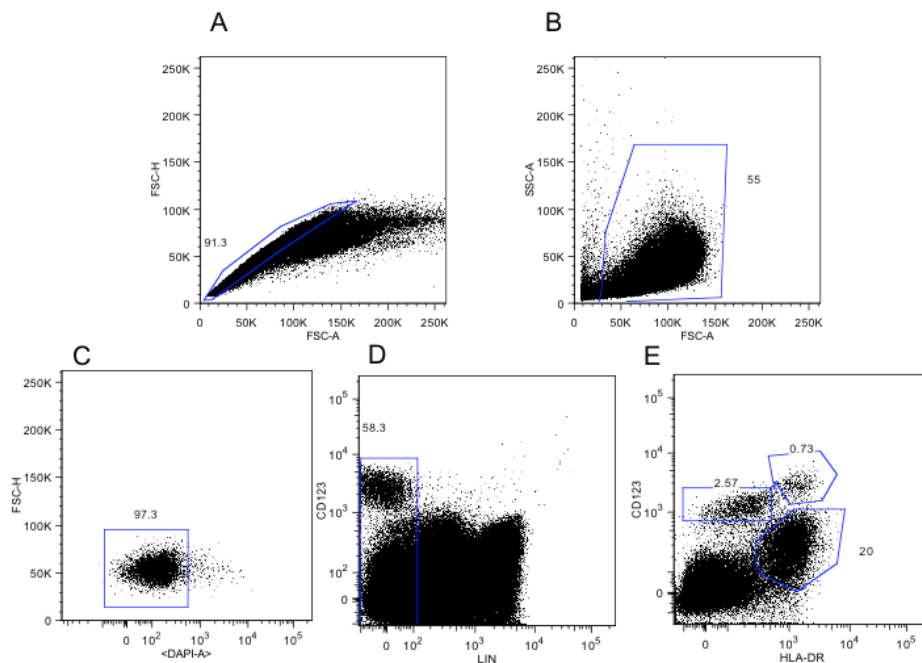
$$\text{Número absoluto de células migrantes de la población celular en estudio} = \frac{\text{\# células migrantes contadas de la población de interés}}{\text{\% que representa la población de interés del total de células migrantes}} * 100$$

**Análisis estadístico.** El análisis estadístico se hizo con el software Prism 5 (GraphPad Software Inc.) y se empleó la prueba t-student no pareada con dos colas y una  $P < 0.05$  fue considerada como significativa.

## 8.RESULTADOS

### Identificación de las subpoblaciones de células linaje negativas presentes en sangre periférica de individuos sanos y de pacientes con psoriasis.

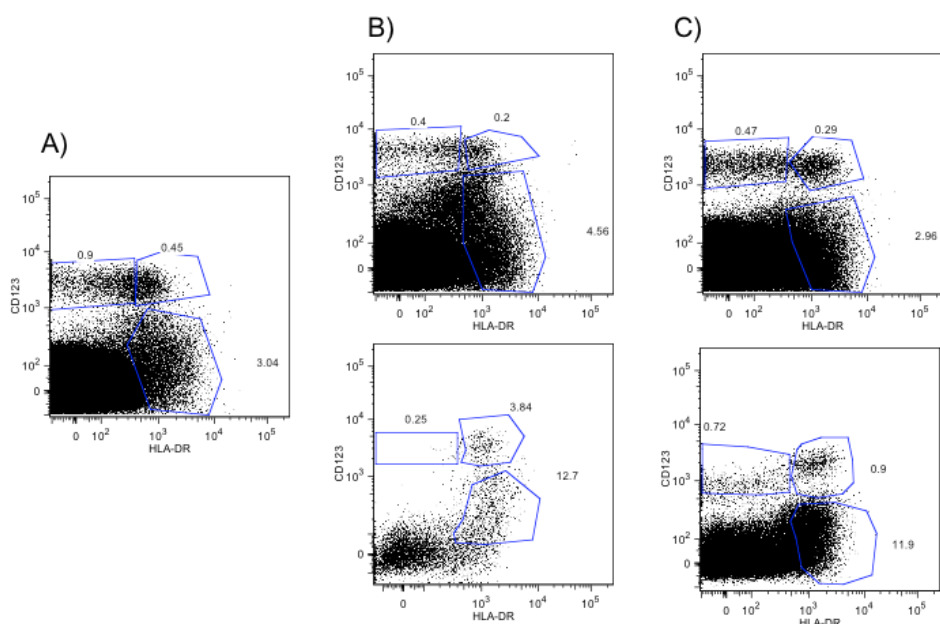
Debido al antecedente acerca de la disminución de la población nDC en SP de pacientes con psoriasis, se decidió hacer la identificación de las distintas poblaciones linaje negativas presentes en la sangre periférica tanto de individuos sanos como de pacientes con psoriasis. Se realizó una tinción de superficie con una mezcla de anticuerpos marcados con distintos fluorocromos los cuales se analizaron por citometría de flujo. Después de descartar células agregadas (**Figura 5A**), detritus celulares (**Figura 5B**) y células no viables (**Figura 5C**), que pudieran estar presentes en el momento de pasar la suspensión celular en el citómetro de flujo.



**Figura 5 . Análisis de células dendríticas presentes en sangre periférica.** Plots representativos de la secuencia de análisis realizado para identificar las subpoblaciones de células dendríticas. A) Región sin células agregadas. B) Exclusión de detritus celulares. C) Células viables. D) Selección de células LIN<sup>-</sup>. E) Subpoblaciones de DCs de interés.

Se analizaron únicamente aquellas células linaje negativo, excluyendo las células que expresan en su superficie los marcadores CD3 (Linfocitos T), CD14 (Monocitos), CD19 (Linfocitos B) y CD56 (“Natural killer”) (**Figura 5D**). A partir de las células linaje negativas y mediante la expresión de los marcadores HLA-DR y CD123 se identificaron dos poblaciones de células dendríticas presentes en sangre periférica las cuales han sido ampliamente descritas en la literatura, las cDC’s y las pDC’s. Además la población descrita en la UIMEA, denominada como nDCs y que se identifica como células HLA-DR<sup>baja</sup> y CD123<sup>alta</sup> (**Figura 5E**).

Considerando los trabajos previos realizados en la UIMEA en donde se encontró que la población nDC estaba disminuida en los pacientes con psoriasis, se determinó en los pacientes incluidos en este trabajo como se encontraban las poblaciones de cDCs, nDCs y pDCs en la sangre periférica. Como se observa en el inciso **B** y **C** de la **Figura 6**, a pesar de que existen diferencias en los porcentajes de las distintas poblaciones de células linaje negativas entre el control sano y los pacientes, la única población que se encuentra consistentemente disminuida en los pacientes con psoriasis tanto crónicos como debutantes es la población de nDCs.

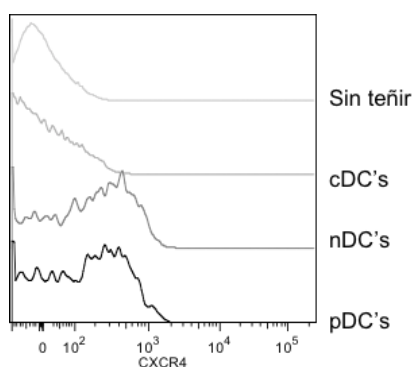


**Figura 6. Subpoblaciones de células dendríticas presentes en sangre periférica.** En la figura se muestran columnas con los gráficos obtenidos de PBMC's de A) Representativo donadores sanos (n=5). B) Pacientes con psoriasis debutantes(n=2). C) Pacientes con psoriasis crónicos (n=2).

Una posible explicación para disminución de las nDCs en la SP de los pacientes es que esta población puede ser movilizada de la SP a la piel en los pacientes con psoriasis por la expresión de distintos estímulos quimiotácticos. Por otra parte se ha demostrado que tanto las cDCs como las pDCs participan en la patogenia de la psoriasis por lo que sería relevante evaluar la movilización de estas poblaciones ante estímulos quimiotácticos presentes en la piel de estos pacientes.

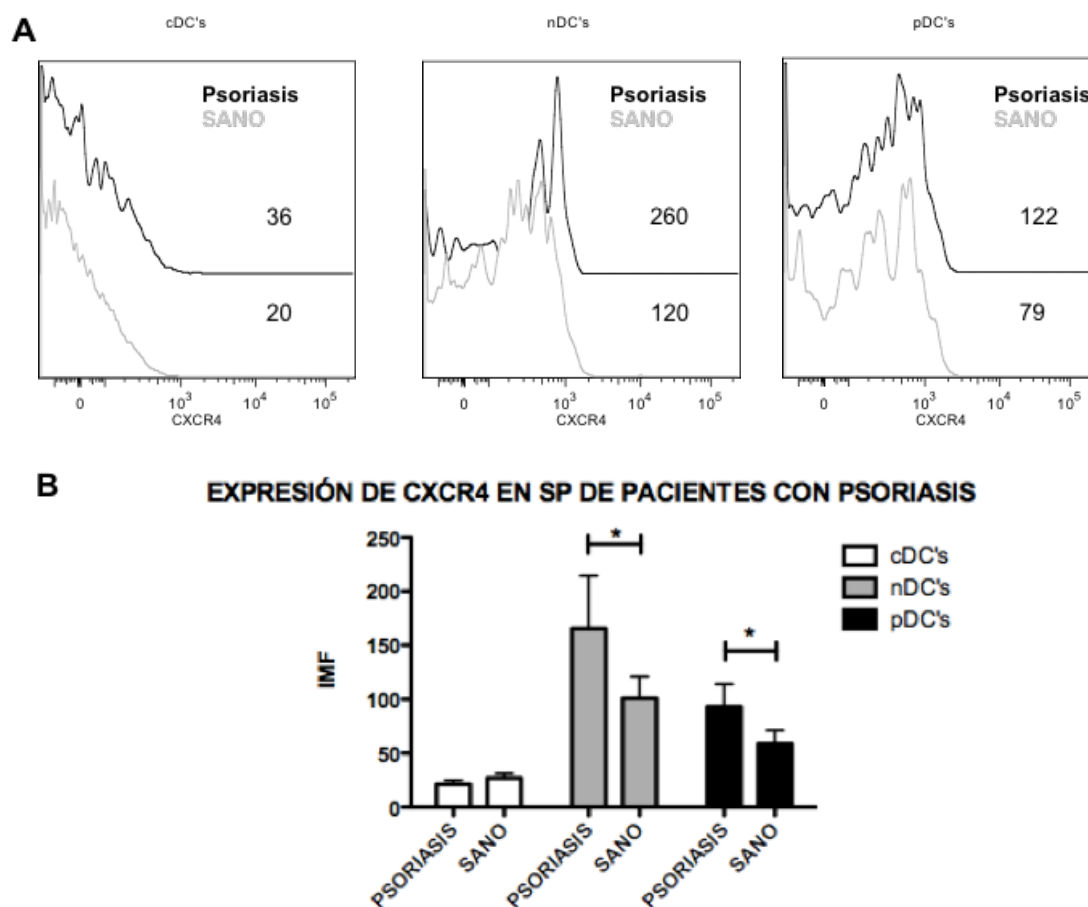
### **Expresión de CXCR4 en células dendríticas presentes en sangre periférica.**

En diversos trabajos se ha propuesto que la quimiocina SDF-1 pudiera tener un papel importante en el reclutamiento de células del sistema inmune hacia los sitios de inflamación crónica, como es el caso de la psoriasis y la artritis reumatoide. La quimiocina SDF-1 actúa a través de la unión a su receptor CXCR4. De esta manera para determinar el potencial de movilización de las células linaje negativos en respuesta a la quimiocina SDF-1, se determinó la expresión de CXCR4 en las distintas poblaciones de células linaje negativas presentes en la sangre periférica de individuos sanos y de los pacientes con psoriasis. Como se observa en el histograma de la **Figura 7** representa las subpoblaciones de DCs en SP un individuo sano y se encontró una clara expresión de CXCR4 tanto en las pDCs como en las nDCs; mientras que las cDCs tienen una baja expresión de este receptor.



**Figura 7. Histograma representativo de la expresión de CXCR4 en células dendríticas presentes en sangre periférica de individuos sanos.** Los histogramas muestran la expresión del receptor de SDF-1;CXCR4 en las tres subpoblaciones de DCs de interés en SP.

Posteriormente se buscó si los pacientes con psoriasis mostraban alguna diferencia en la expresión de CXCR4 en las distintas poblaciones de células linaje negativas. En el inciso **A** de la **Figura 8** se muestra un ejemplo representativo de los histogramas que indican la expresión de CXCR4 en DC de SP comparando a un sujeto sano y un paciente. En la **Figura 8B** el valor numérico mostrado representa la intensidad media geométrica de fluorescencia (IMGF), las barras representan el promedio de 3 sujetos sanos y 3 pacientes con psoriasis, observándose que los pacientes con psoriasis incluidos en este trabajo muestran mayor expresión de este receptor tanto las nDC como las pDC en comparación con sujetos sanos. Cabe resaltar que estas diferencias son significativas ( $p < 0.05$ ).

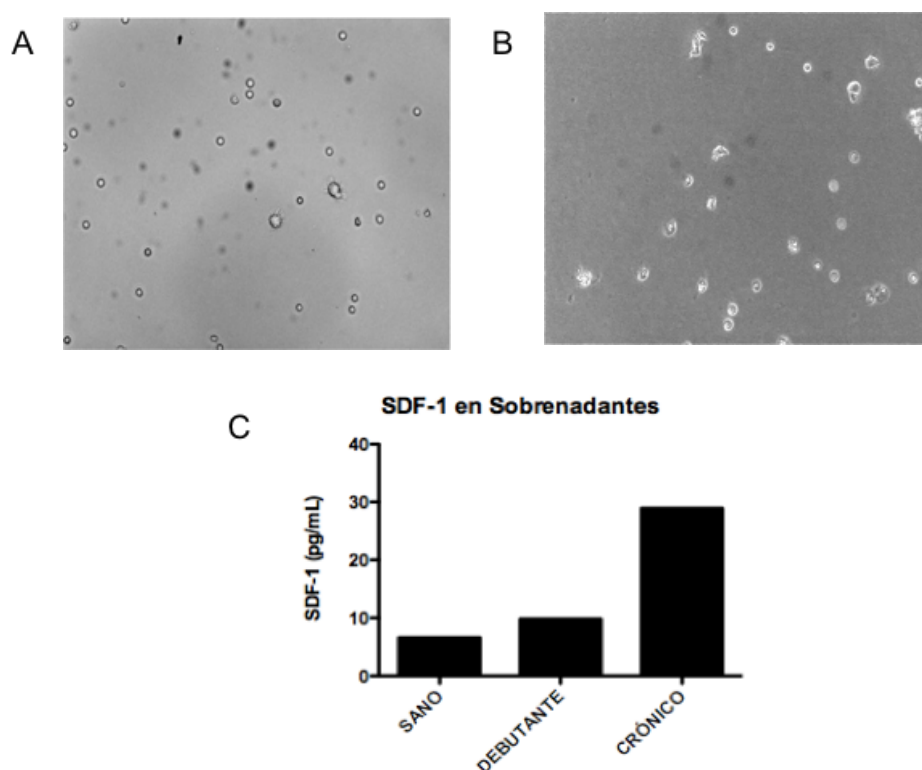


**Figura 8. Expresión de CXCR4 en DCs de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con psoriasis.** Los histogramas en A) muestran la intensidad media geométrica de fluorescencia (IMGF) de CXCR4. B) Las barras representan el promedio de IMGF de CXCR4 en 3 sujetos sanos y 3 pacientes con psoriasis. En ambas figuras se muestran las cDCs, nDCs y pDCs.  $*=P < 0.05$



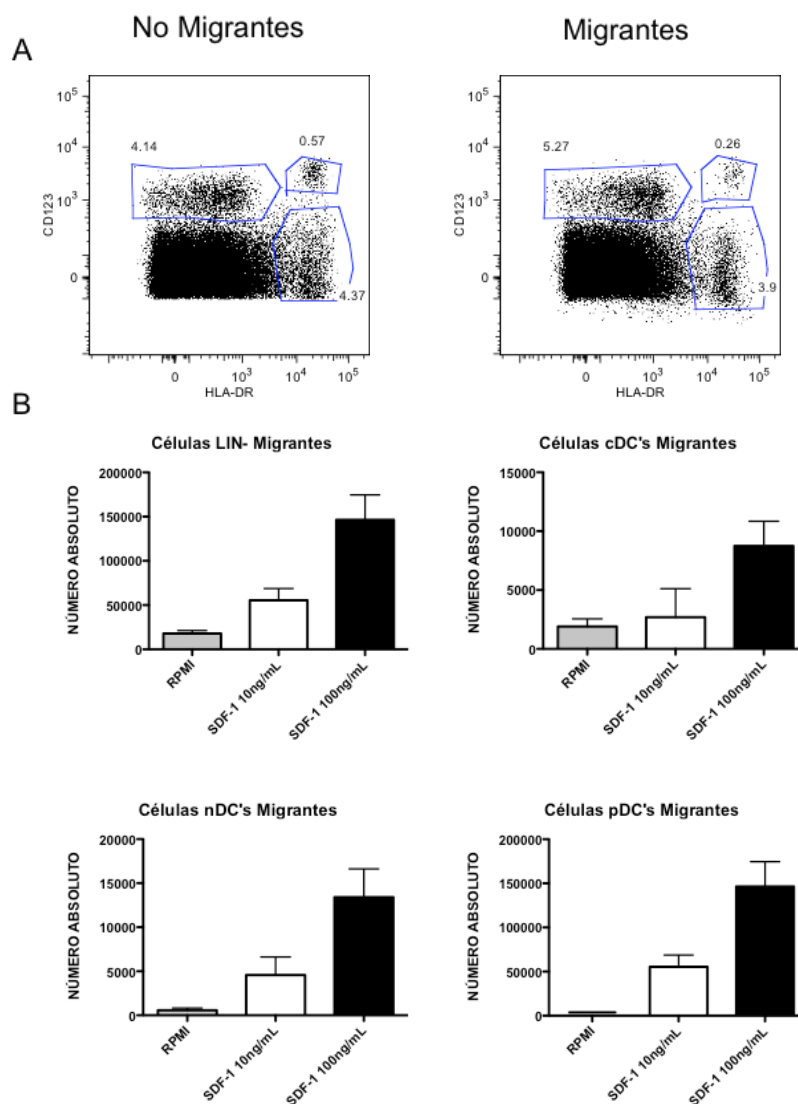
## Cultivos de dermis lesionada de pacientes con psoriasis y evaluación del potencial quimioatrayente de SDF-1 en células dendríticas de sangre periférica.

Una vez determinada la expresión de CXCR4 en las subpoblaciones de interés, se realizaron cultivos celulares a partir de las biopsias tomadas de piel lesionada de pacientes además de biopsias de pacientes con piel no lesionada y biopsias de piel de individuos sanos. Después de separar la dermis y la epidermis se colocaron por separado en medio RPMI 1640 suplementado, se recolectaron los sobrenadantes de dermis para determinarles, mediante una ELISA, la cantidad de SDF-1 presente en los sobrenadantes de los distintos pacientes. Como se puede observar en el inciso **C** de la **Figura 9** se encontró una mayor producción de SDF-1 en los pacientes con psoriasis comparado con el sobrenadante de piel sana.



**Figura 9. Cultivos de piel de pacientes con psoriasis y cuantificación de SDF-1 presente en los sobrenadantes.** A) Dermis de paciente crónico con psoriasis. B) Dermis de paciente debutante con psoriasis. C) ELISA para SDF-1. Se muestra la concentración de la quimiocina en pg/mL. Cada barra representa 1 sobrenadante.

Para determinar si SDF-1 podría participar en la movilización de las distintas poblaciones de células linaje negativas de la sangre periférica a la piel, se realizaron ensayos de migración en un sistema transwell, donde se adicionó SDF-1 a concentraciones de 10 y 100 ng/ml. Como se puede observar en la **Figura 10A**, se observó movilización de las distintas poblaciones de células linaje negativas en respuesta a la quimiocina SDF-1.



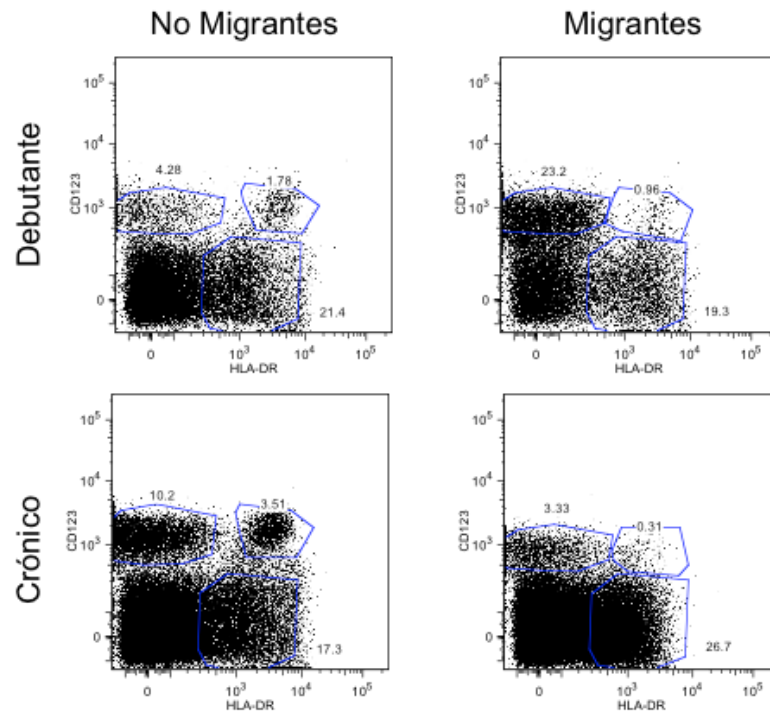
**Figura 10. Células linaje negativa migrantes en respuesta a dos concentraciones diferentes de SDF-1.** En A) Se muestran los plots representativos de la migración de las células linaje negativas en respuesta a SDF-1 100ng/mL. En B) se muestra el número de células migrantes LIN- así como cDC's, nDC's y pDC's. Cada barra representa el promedio de 2 experimentos independientes y las DCs fueron obtenidas de individuos sanos.

Aunque a 10 ng/ml se observa una movilización importante de las distintas poblaciones se observa una mejor respuesta a 100ng/mL (**Figura 10B**) por lo que en experimentos posteriores se utilizó solamente esta dosis.

**Migración de las subpoblaciones de células linaje negativas presentes en la sangre periférica de individuos sanos en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes en cultivos de dermis de pacientes con psoriasis.**

Para determinar si en la piel lesionada y no lesionada de pacientes con psoriasis existen estímulos quimiotácticos que pudieran inducir la movilización de células dendríticas (cDC's, nDC's, pDC's) presentes en sangre periférica de sujetos sanos, se realizaron experimentos de migración en respuesta a los sobrenadantes obtenidos de dermis lesionada de pacientes con psoriasis activa tanto de piel lesionada como de piel no lesionada cercana a la lesión.

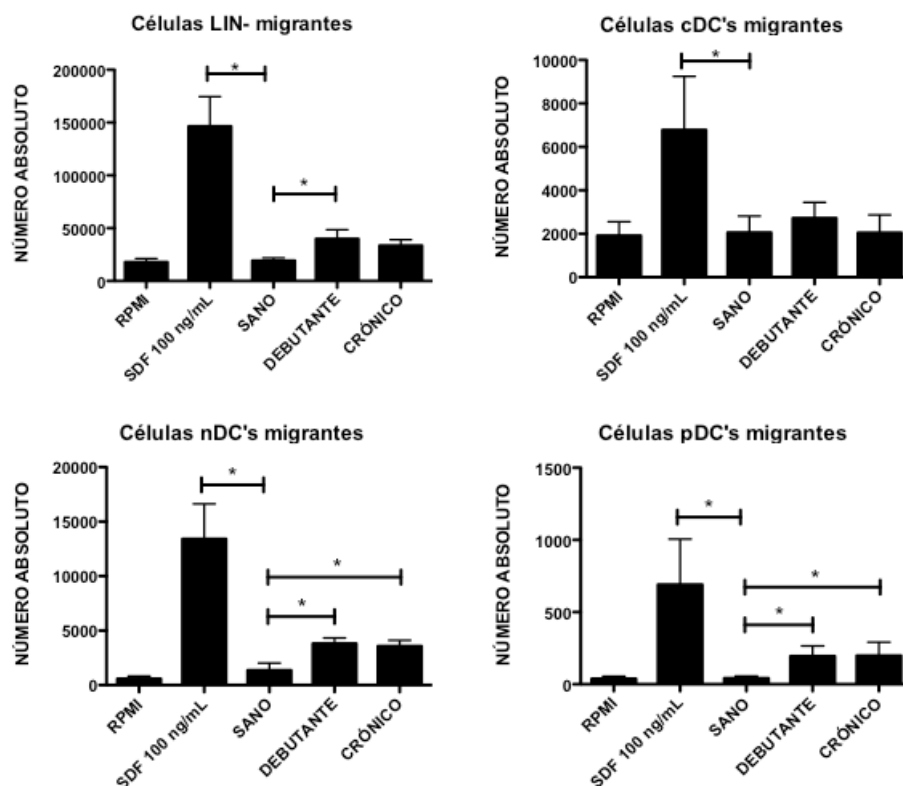
En los ensayos de migración se utilizaron sobrenadantes de pacientes debutantes y crónicos, así como sobrenadantes de individuos sanos; y como control positivo de migración se empleó la quimiocina SDF-1. En la **Figura 11** se muestra un ejemplo de la movilización de las subpoblaciones de células linaje negativo en respuesta a SN de pacientes de piel lesionada de pacientes con psoriasis debutante y crónica.



**Figura 11. Migración de células dendríticas en respuesta a sobrenadantes de piel de pacientes debutantes y crónicos con psoriasis.** La figura ilustra las células LIN<sup>-</sup> presentes en el experimento de migración (no migrantes) y las células que se movilizaron en respuesta a los SN utilizados (migrantes).

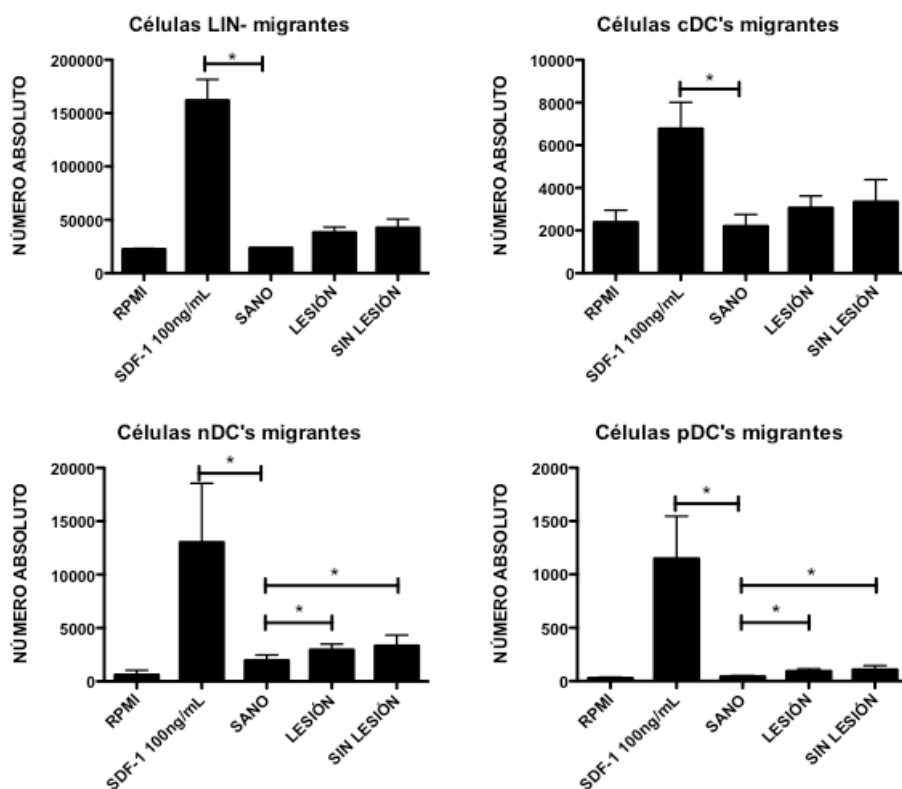
Se observa que hay mas nDC migrantes con el SN del paciente debutante en comparación con el SN del crónico. De manera contraria hay mas cDC migrantes con el SN de paciente crónico que en SN de paciente debutante. Por lo tanto se decidió realizar ensayos de migración donde se utilizaron SN de pacientes crónicos y debutantes, para confirmar las diferencias observadas en el experimento anterior acerca movilización de las células subpoblaciones LIN<sup>-</sup>.

La **Figura 12** muestra los resultados de 3 experimentos de migración y se observa que no existe una diferencia importante en la movilización de células LIN<sup>-</sup> entre el SN debutante y SN crónico ni en la movilización en las cDC, nDC y pDC, pero si las hay en nDC y pDC al comparar cada unos de estos SN con respecto al sano ( $P < 0.05$ ). Por lo tanto en los experimentos posteriores se utilizaron ambos sobrenadantes solo que al analizar los datos se incluyeron en un solo grupo denominado "Psoriasis".



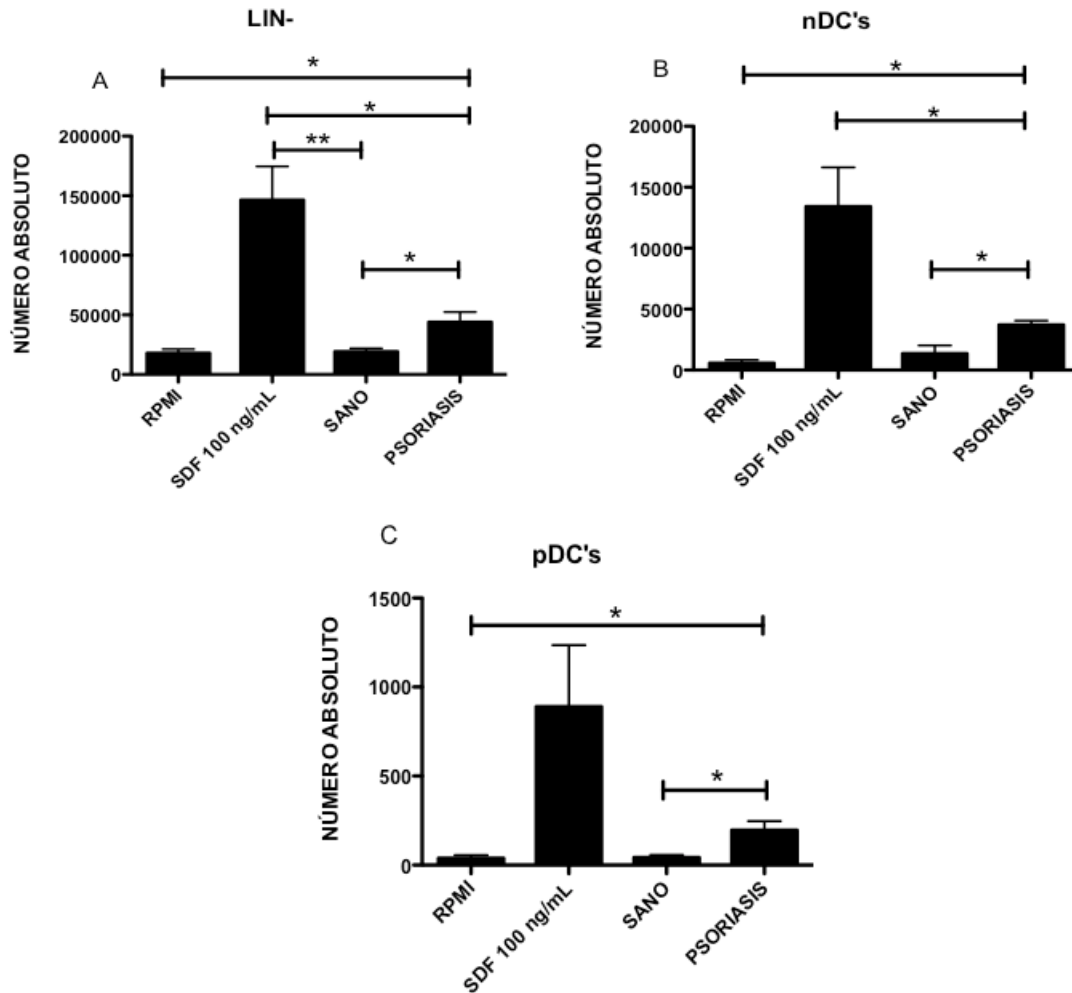
**Figura 12. Migración de células LIN- y CD's en respuesta a SN crónicos y debutantes con psoriasis.** Se muestra el numero absoluto de células migrantes y las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes. \*= $P < 0.05$

Posteriormente se cuantificaron los números absolutos de células Lin<sup>-</sup> que se movilizaron en presencia de los SN de las lesiones de los pacientes con psoriasis (activa y crónica), de piel no lesionada de los mismos pacientes y de el sujeto sano. Como un control positivo de movilización se utilizó SDF-1. De acuerdo a lo que se muestra en la **Figura 13**, se observa un incremento en la movilización tanto en respuesta a los estímulos quimiotácticos presentes en la piel lesionada como en la no lesionada de los pacientes con psoriasis mostrando diferencias significativas ambos sobrenadantes con respecto al sano en las nDC y pDC, aunque no se observan diferencias significativas entre estos dos grupos. Cabe resaltar que la migración con SN de los pacientes es mucho menor que la observada en respuesta a SDF-1.



**Figura 13 .Migración de células LIN- en respuesta a SN de lesión y sin lesión de pacientes con psoriasis.** La figura ilustra los promedios de 3 experimentos independientes para cada una de las subpoblaciones de interés. Se utilizaron DCs de individuos sanos. Los asteriscos indican una diferencia significativa  $P < 0.05$ .

Posteriormente se cuantificaron los números absolutos de células  $Lin^-$  que se movilizaron en presencia de los SN de pacientes con psoriasis, de sujetos sanos y en presencia de SDF-1 en cuatro experimentos independientes. La movilización que se observa en la **Figura 14** dada por el medio de cultivo es similar a la observada por los SN de los sanos. Sin embargo, se observa que existe una diferencia significativa en la movilización de las células linaje negativas totales al comprar la migración inducida por los SN de pacientes con psoriasis con respecto al sano ( $p < 0.05$ ). También se observa una movilización significativa de la población nDC en los SN de pacientes con respecto al sano.



**Figura 14. Migración de las subpoblaciones de células dendríticas presentes en sangre periférica en respuesta a diferentes estímulos quimiotácticos.** A) Células linaje negativas. B) Células dendríticas caracterizadas en el laboratorio (nDC's). C) Células dendríticas plasmacitoides (pDC's). Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes y los asteriscos indican diferencias significativas  $*=P<0.05$  y  $**=P<0.01$ .

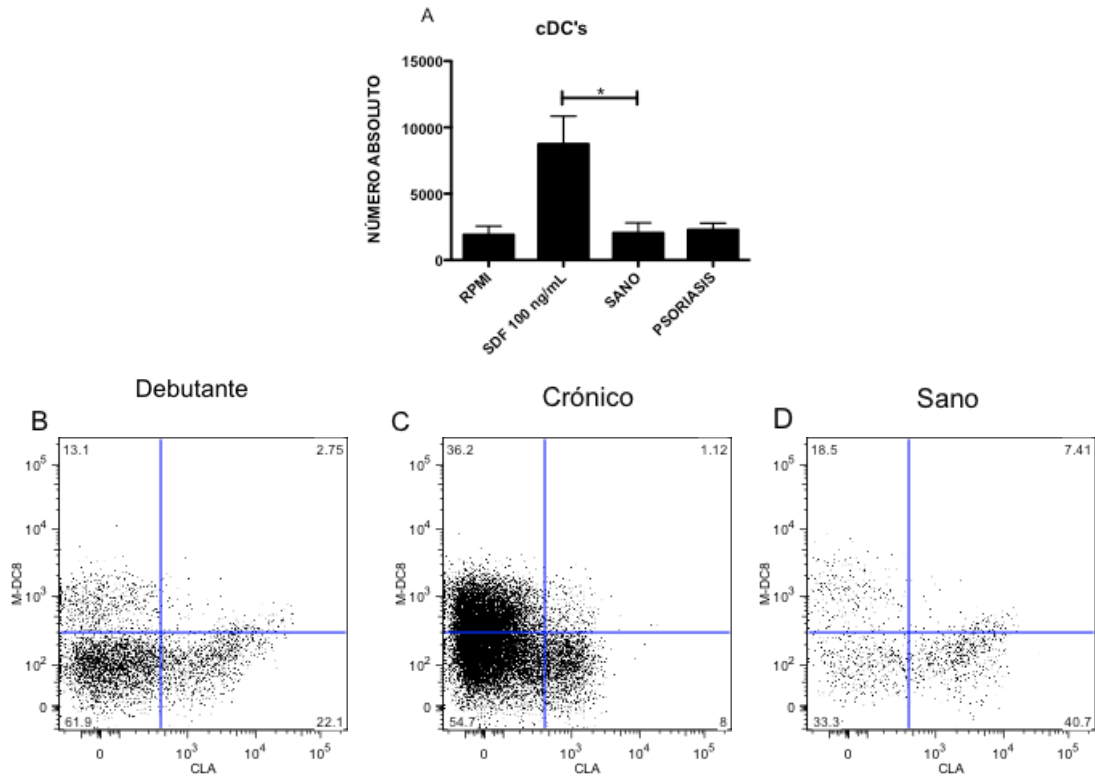
A pesar de que se observan diferencias significativas en las pDCs al comparar los la movilización inducida por los SN de los pacientes con respecto al sano los números que se movilizan de esta población son mucho menores que los observados para las linaje negativas totales y para las nDCs. En todos los casos la movilización observada para las distintas poblaciones en presencia de los SN de los pacientes con psoriasis fue menor a la observada para la quimiocina SDF-1.

### **Migración de las distintas poblaciones de cDCs en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes en cultivos de dermis lesionada de pacientes con psoriasis.**

Se ha reportado la presencia de DCs con características inflamatorias en la piel de pacientes con psoriasis y una propuesta para el origen de estas células es una población de DCs presentes en la SP que expresan el marcador M-DC8.

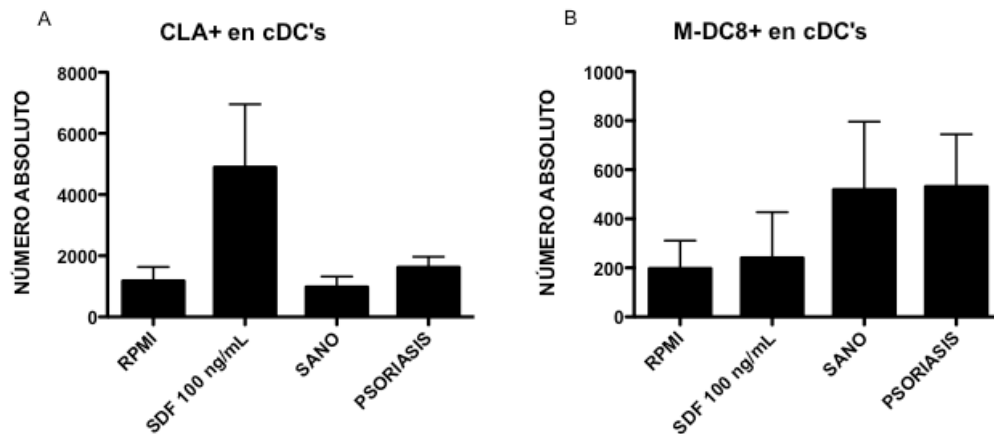
Además, dentro de las DCs de sangre periférica existe otra subpoblación de DCs que expresan el marcador CLA el cual ha sido asociado con “homing” a piel. Por lo tanto, se analizó la expresión de estos marcadores en las cDCs que migraron en respuesta a SN de pacientes y en respuesta a SDF-1. Como se puede observar en los incisos **B y C** de la **Figura 15** ambas poblaciones de células parecen movilizarse en respuesta a los SN de cultivo de pacientes; se observó además que el sobrenadante de pacientes con psoriasis crónica provocó una mayor movilización de las células M-DC8<sup>+</sup> en comparación con el sobrenadante de paciente debutante.





**Figura 15. Células dendríticas convencionales migrantes.** A) Número absoluto de células dendríticas convencionales migrantes en respuesta a diferentes estímulos. B) Gráfico representativo de cDC's positivas para CLA y M-DC8 en respuesta a sobrenadante de paciente con psoriasis debutante. C) Sobrenadante de paciente con psoriasis crónica. D) Sobrenadante de individuo sano. \*= $P < 0.05$

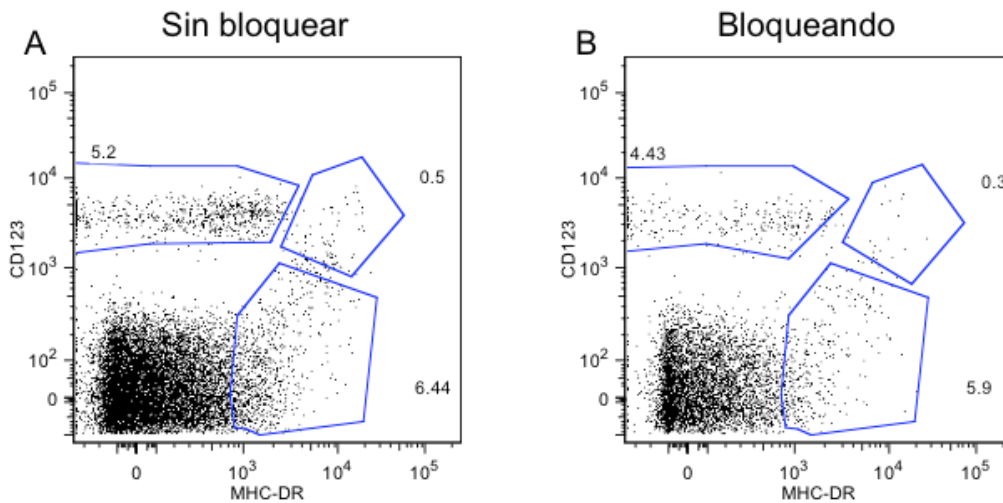
Sin embargo, al realizar el análisis de varios experimentos independientes, no se encontró diferencia significativa alguna entre las cDCs totales y ninguna de las sub-poblaciones de cDCs analizadas cuando se comparó la migración inducida por los SN de pacientes y de los sanos aunque existe una tendencia a una mayor movilización de las células CLA<sup>+</sup> en presencia de los SN con psoriasis con respecto al sano. En respuesta a SDF-1 se observó una mayor migración de la población CLA<sup>+</sup> con respecto a la M-DC8 positiva en la que prácticamente no se observan diferencias con respecto al medio de cultivo (**Figura 16**).



**Figura 16. Células CLA<sup>+</sup> y M-DC8<sup>+</sup> en las subpoblaciones cDC's presentes después de ensayos de migración en respuesta a diferentes estímulos quimiotácticos.** En las gráficas se muestra el número absoluto de células en A) CLA positivas y en B) M-DC8 positivas, ambos marcadores en las cDCs. Cada barra es el promedio de 3 experimentos independientes.

### **Efecto del bloqueo del receptor CXCR4 en la migración de células dendríticas de sangre periférica en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes en sobrenadantes de pacientes con psoriasis activa.**

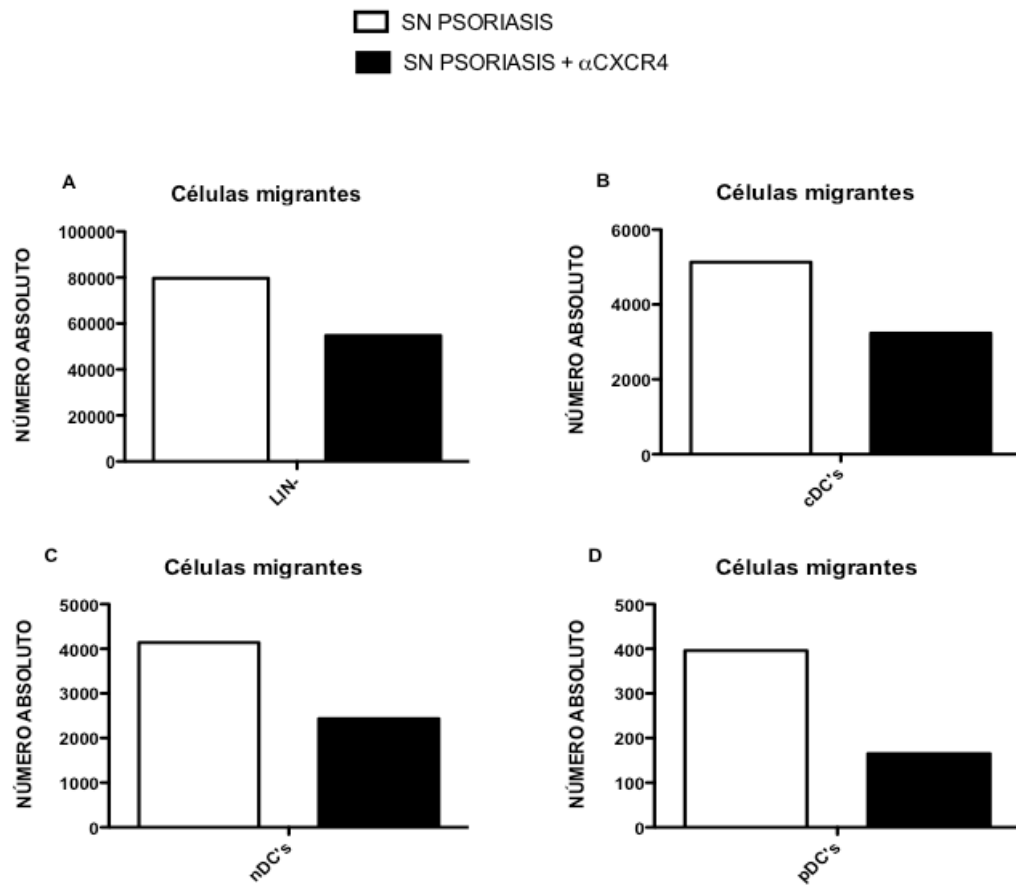
Para determinar si la migración observada utilizando los sobrenadantes de pacientes con psoriasis se debe a la presencia de SDF-1, se comparó la migración inducida por SN psoriasis sobre las PBMC's en las que se bloqueó con  $\alpha$ -CXCR4 50 $\mu$ g/mL. La **Figura 17** muestra el resultado de la migración observada en las distintas poblaciones de células linaje negativas de SP que respondieron al estímulo quimiotáctico presente en el SN psoriasis con y sin bloqueo del receptor CXCR4. Se observa claramente que hay una disminución en la movilización de las tres poblaciones de células linaje negativas de interés (cDC's, nDC's y pDC's) así como de las células LIN<sup>-</sup> totales.



**Figura 17. Efecto del bloqueo del receptor CXCR4 en la migración de células dendríticas en respuesta a estímulos presentes en sobrenadante de dermis de paciente con psoriasis.** En la figura se muestran los plots de las subpoblaciones de células dendríticas migrantes en respuesta a sobrenadante de paciente con psoriasis. A) Únicamente sobrenadante. B) Las PBMC's empleadas se bloquearon  $\alpha$ -CXCR4 a una concentración 50 $\mu$ g/mL.

En la **Figura 18** podemos observar estos resultados al graficar los números absolutos de células que migraron en respuesta a los SN de cultivos de paciente con psoriasis en presencia y ausencia del bloqueador de CXCR4.

Este experimento nos permite proponer que SDF-1 podría participar de manera importante en la redistribución de las distintas poblaciones de células linaje negativas de la SP a la piel de pacientes con psoriasis activa.



**Figura 18. Efecto del bloqueo del receptor CXCR4 en los números absolutos de las células migrantes linaje negativo y dendríticas.** El gráfico muestra los números absolutos de un experimento de migración de 3 horas, mostrando las diferentes subpoblaciones de interés usando SN paciente con psoriasis debutante.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La importancia de las células dendríticas dentro de la patogenia de diversas enfermedades inflamatorias cutáneas crónicas, incluida la psoriasis, ha ido creciendo debido a la publicación de diversos trabajos<sup>13,14,29,54,76</sup>. Poblaciones como las pDCs, cDCs y recientemente una subpoblación de cDCs M-DC8<sup>+</sup>, se propone que participen en el mecanismo de inicio, amplificación y mantenimiento del proceso inflamatorio local. Sin embargo, algunas de estas poblaciones no se encuentran en piel sana o bien, están presentes solo que en números bajos. Este hecho ha permitido proponer hipótesis acerca del origen de estas células. Por una parte existe la hipótesis que sugiere la existencia de alguna célula precursora en el sitio. Otra hipótesis es que posiblemente estas células pueden migrar de la sangre periférica hacia la piel en condiciones de inflamación.

Debido a estos antecedentes aunados al hallazgo de la UIMEA acerca de la disminución de nDCs en SP de pacientes con psoriasis, en este trabajo se buscó conocer el potencial migratorio de las subpoblaciones de DC's presentes en sangre periférica de individuos sanos en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes en piel lesionada de pacientes con psoriasis activa.

En cuanto a las poblaciones de DCs en la sangre periférica de los pacientes con psoriasis se observó que solamente la población nDC se encuentra consistentemente disminuida en los pacientes con psoriasis en comparación con individuos control, esto concuerda con los resultados previos obtenidos en la UIMEA en donde se encontró esta población disminuida en los pacientes con psoriasis y esta disminución correlaciono con la actividad de la enfermedad.

En este momento no contamos con los datos de actividad de los pacientes incluidos en este trabajo para determinar si nuevamente la frecuencia de nDC en SP correlaciona con el grado de actividad. Una hipótesis que se abordó en este trabajo fue que la disminución de las nDC en SP es una posible re-distribución hacia la piel lesionada.

Con respecto a las poblaciones de DCs; no se observaron diferencias en los porcentajes de cDC totales en los pacientes con psoriasis y controles, este dato es consistente con lo que ha sido reportado en la literatura para esta población. A pesar de que no existe disminución en los número de cDCs existen trabajos en la literatura que apoyan la hipótesis que DCs de SP son capaces de movilizarse en respuesta a factores quimiotácticos como CXCL12, el cual esta presente en la piel psoriática. Para el caso de las pDCs tampoco se observaron diferencias a pesar de que existen evidencias en modelos experimentales de su posible re-distribución de la SP a la Piel<sup>69</sup>.

Pensando que CXCL12 pudiera ser un factor quimiotáctico importante para la potencial movilización de las distintas poblaciones de células linaje negativas de SP, se determinó la expresión de su receptor, CXCR4 en las distintas poblaciones de estudio y, se encontró que estaba expresado de manera importante en las pDC, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura<sup>90</sup>. En concordancia con los antecedentes del laboratorio, las nDCs expresaron CXCR4 incluso más que las pDC. Mientras que las cDCs parece que no lo expresan o lo hacen cantidades no detectables por citometría de flujo. Al comparar la expresión de CXCR4 entre los pacientes con psoriasis y los sanos se observo una mayor expresión del receptor tanto en las nDCs como en las pDCs de los pacientes. Estos resultados indican que tanto las pDCs como los nDCs podrían responder al el estímulo con SDF-1 y que esta respuesta podría estar potenciada el los pacientes con psoriasis.

Con los resultados anteriores sumados a la presencia de SDF-1 en los sobrenadantes de cultivo de piel lesionada y siendo mayor con respecto a piel sana, se pudo plantear la posibilidad de que uno de los posibles factores quimioatrayentes involucrados en la disminución de las nDCs y la posible movilización de las poblaciones linaje negativas a la piel lesionada pudiera estar mediada por CXCL12 (SDF-1).

Por lo tanto se evaluó el potencial quimioatrayente de SDF-1 en las distintas poblaciones LIN- de SP. Los resultaron mostraron una respuesta dosis

dependiente de la población LIN<sup>+</sup> totales, nDC y pDCs en respuesta a SDF-1. La respuesta fue mayor al utilizar la concentración de 100 ng/mL. En la población de cDCs en la que no se observó una franca expresión del receptor de SDF-1 (CXCR4) solo se observa movilización al utilizar 100ng/ml de la quimiocina lo que indica que los niveles de expresión del receptor son bajas y que solamente se logra una consecuencia funcional al utilizar concentraciones altas de la quimiocina.

Posteriormente se evaluó la capacidad de migración de las distintas poblaciones de células LIN<sup>-</sup> de SP en respuesta a factores quimiotácticos presentes en los SN de dermis de los pacientes con psoriasis activos debutantes de la enfermedad y con una enfermedad crónica. En un principio se encontraron diferencias en la movilización de las distintas poblaciones en estos dos tipos de pacientes, por ejemplo; se observó una mayor migración de las nDCs en respuesta a SN de pacientes debutantes mientras que las cDCs se movilizaron más cuando estuvieron en contacto con SN de pacientes crónicos. Sin embargo, al hacer el análisis de más experimentos, se encontró que no existe diferencia en la movilización generada entre los SN debutantes y crónicos, aunque ambos SN mostraron tener mayor potencial quimioatrayente de las poblaciones nDCs y pDCs en comparación con SN sano. Lo anterior indica que en los SN de los cultivos celulares, de dermis de los pacientes debutantes que inician la formación de lesiones así como en lesiones crónicas, están presentes factores quimiotácticos capaces de atraer a las células de la sangre periférica de individuos sanos.

Considerando que en los SN de cultivo de piel lesionada de pacientes con psoriasis podrían estar presentes factores quimiotácticos capaces de reclutar poblaciones celulares de SP una pregunta importante era si esto solo ocurría con los cultivos celulares de la lesión o incluso en la piel no lesionada (cercana a la lesión) podrían estar presentes factores quimiotácticos capaces de reclutar a las distintas poblaciones celulares. De manera interesante se observó que tanto los SN de piel lesionada como de no lesionada mostraron un efecto quimioatrayente de las distintas poblaciones de células LIN<sup>-</sup> de sangre periférica, particularmente

las nDCs y las pDCs. Este hallazgo concuerda con lo reportado en la literatura ya que existen trabajos que demuestran que en piel no lesionada hay infiltrados celulares y marcas tanto celulares como moleculares aún antes de la formación de una lesión.

Nuestros resultados apoyan fuertemente la movilización tanto de nDCs como de pDCs en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes en la piel de los pacientes con psoriasis; en el caso de las pDCs el hallazgo de que se pueden movilizar inclusive en respuesta a factores quimiotácticos presentes en piel no lesionada apoya la evidencia de que estas células pudieran participar en etapas tempranas de la formación de las placas psoriáticas<sup>70</sup>. Ya que como se ha descrito en la literatura, son capaces de reconocer componentes endógenos e iniciar los procesos para generar las lesiones. En el caso de las nDCs se encontró que también migran en respuesta a quimioatrayentes de piel tanto lesionada como sin lesión, lo cual sugiere que estas células pudieran participar también en el inicio de las placas psoriáticas como células efectoras directas o como precursoras de una población que se diferencie en la piel por el microambiente inflamatorio.

Sorprendentemente en nuestros experimentos no encontramos una movilización importante de las cDCs totales ni de las sub-poblaciones CLA<sup>+</sup> y M-DC8<sup>+</sup> en respuesta a los SN de pacientes con respecto a los controles. Una posible explicación para este resultado son los niveles bajos de expresión de expresión del receptor CXCR4 en esta población aunado a que los niveles de SDF-1 en los SN de los pacientes también lo fueron.

Durante la comparación de SN de pacientes debutantes y crónicos, se observó una migración diferencial de la subpoblación cDCs M-DC8<sup>+</sup> en respuesta a SN de paciente crónico. Este resultado concordaba con la literatura<sup>54</sup>, ya que se encontró la presencia de estas células que expresan esta molécula en biopsias de piel psoriática, por lo que se pensó que eran capaces de re-distribuirse de la SP hacia la piel de los pacientes crónicos. Sin embargo, al realizar el análisis de un mayor número de experimentos y buscar esta diferencia, no se encontraron diferencias



estadísticamente significativas en la movilización de cDCs totales ni de las subpoblaciones CLA<sup>+</sup> o M-DC8<sup>+</sup>. Esto podría deberse a que en el trabajo donde se reportó esta movilización, lo hicieron con cDCs M-DC8<sup>+</sup> purificadas de SP y, en este trabajo se realizó con PBMC totales, con lo cual el resto de las células pudieran estar interfiriendo con su capacidad de movilización.

Nuestros resultados indican que las cDCs son capaces de moverse solamente en presencia de altas concentraciones de SDF-1 las cuales, en el modelo experimental que se utilizó en este trabajo no son suficientes para inducir la movilización. Es posible además que la migración de esta población dependa de otros factores quimiotácticos que puedan actuar solos o en conjunto con SDF-1.

Al analizar el marcador CLA en las cDCs migrantes, tampoco se encontraron diferencias entre los SN de pacientes y los sanos. Lo cual nos podría indicar que a pesar de que expresen el antígeno leucocitario humano necesitan de altas concentraciones de quimiocinas o de la presencia de otros factores quimiotácticos ausentes en nuestros experimentos. Nuevamente se observó una respuesta a SDF-1, por lo que se puede sugerir de manera más confiable que la cantidad de CXCR4 expresado en las cDCs es muy bajo y que solo responde a altas concentraciones de esta quimiocina.

Finalmente, al bloquear CXCR4 en las DCs de sangre periférica, se observó una disminución en la migración de todas las poblaciones evaluadas, sobre todo en las nDCs y pDC's. Este resultado sugiere fuertemente que la migración de las distintas poblaciones de células LIN- de SP en respuesta a los sobrenadantes de cultivos de dermis de pacientes con psoriasis es debida en parte a SDF-1. Considerando que el bloqueo de la migración no fue completo es posible que otras quimiocinas puedan estar participando en la movilización de las distintas poblaciones celulares de manera independiente o en conjunto con SDF-1.

Como parte de los cambios fisiológicos en la piel psoriática, se ha propuesto que uno de los tejidos que se incrementan son los vasos sanguíneos. Existe evidencia

que indica la presencia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) en la piel psoriática, el cual promueve la generación de vasos sanguíneos, posiblemente debido al estado de inflamación crónica local que presentan los pacientes<sup>94</sup>.

Debido a esta angiogénesis es muy probable que SDF-1 también se encuentre en las lesiones de los pacientes debido a lo reportado, esta quimiocina participa en diversos procesos fisiológicos, incluidos la angiogénesis. Además se ha reportado que el VEFG incrementa la expresión de CXCR4 así como de CXCL12<sup>95</sup>, con lo cual su presencia en la piel psoriática, además de su función principal, también es capaz de atraer a DC's de SP.

En resumen podemos concluir que la disminución de las nDCs en la sangre periférica de pacientes con psoriasis posiblemente se debe a una re-distribución hacia la piel en condiciones inflamatorias. El potencial para generar la migración de las DCs de SP hacia la piel en respuesta a los factores quimiotácticos presentes en los SN de los pacientes es evidente, principalmente en las subpoblaciones nDCs y pDCs. Estas dos subpoblaciones son susceptibles de responder a SDF-1 debido a que en su superficie expresan su receptor que es CXCR4 en mayor proporción con respecto a DCs de sangre periférica de individuos sanos.

Nuestros resultados sugieren de manera importante que SDF-1 además de estar presente en los sobrenadantes de la dermis de los pacientes con psoriasis activa, es capaz de movilizar a las todas las subpoblaciones de interés, sin embargo, es posible se necesite una mayor cantidad para inducir movilización en las cDCs.

Finalmente se puede proponer a SDF-1 como uno de los factores quimioatrayentes presente en la piel de pacientes con psoriasis activa y que pudiera estar favoreciendo la re-distribución de las subpoblaciones nDCs y pDCs de la sangre periférica hacia la piel bajo condiciones de inflamación crónica, como es el caso de la psoriasis.

## CONCLUSIONES

- La población de nDCs presente en la sangre periférica de pacientes con psoriasis esta disminuida considerablemente en comparación con la presencia de esta mismas células en sangre periférica de individuos sano.
- En las células linaje negativas de sangre periférica de pacientes con psoriasis hay una mayor expresión de CXCR4 en las poblaciones nDCs y pDCs en comparación con células de individuos sanos.
- SDF-1 esta presente en los sobrenadantes de dermis lesionada de los pacientes.
- Las células linaje negativas de SP son capaces de movilizarse en respuesta a SDF-1.
- Hay una mayor migración de subpoblaciones como nDCs y pDC's en respuesta a los estímulos quimiotácticos presentes en los sobrenadantes de pacientes con psoriasis activa en comparación con la migración ocurrida con sobrenadantes de piel sana.
- Dentro del modelo estudiado, la migración inducida por SN de pacientes con psoriasis activa si es dependiente de SDF-1.

## REFERENCIAS

1. Lowes, M. A., A. M. Bowcock, et al. 2007. *Pathogenesis and therapy of psoriasis*. Nature 445(7130): 866-873.
2. Krueger JG, Bowcock A 2005. *Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis*. Ann Rheum Dis 64:ii30–ii36.
3. Griffiths CE, Barker JN. 2007. *Pathogenesis and clinical features of psoriasis*. Lancet ;370:263-71.
4. Lew W et al 2004. *Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and “Type 1” inflammatory gene expression*. Trends Immunol 25(6):295–305.
5. Griffiths CEM, Camp RDR, Barker JNWN. *Psoriasis*. In: Burns DA, Breathnach SM, Cox NH, Griffiths CEM, eds. *Rook’s textbook of dermatology, 7th edn*. Oxford: Blackwell, 2005: 35.1–35.69.
6. Bowcock, A. M. and J. G. Krueger 2005. *Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis*. Nature Reviews Immunology 5(9): 699-711.
7. Capon F, Munro M, Barker J, Trembath R. 2002. *Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene*. J Invest Dermatol ;118:745-51.
8. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, et al. 2007. *A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes*. Am J Hum Genet;80:273-90.
9. Capon F, Di Meglio P, Szaub J, et al. 2007. *Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis*. Hum Genet ;122:201-6.
10. De Cid, R. et al. 2009. *Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis*. Nature Genet. **41**, 211–215.
11. Nair, R. P. et al. 2009. *Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF- $\kappa$ B pathways*. Nature Genet. **41**, 199–204.
12. Braun-Falco O, Burg G. 1970. *Inflammatory infiltrate in psoriasis vulgaris: a cytochemical study*. Arch Klin Exp Dermatol 236:297-314.
13. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM, Cormane RH. 1983.

*Immunocompetent cells in psoriasis: in situ immunophenotyping by monoclonal antibodies.* Arch Dermatol Res;275:181-9.

14. Nestle FO, Nickoloff BJ. 1994. *Role of dendritic cells in benign and malignant lymphocytic infiltrates of the skin.* Dermatol Clin;12:271-82.

15. Curry JL, Qin JZ, Bonish B, Carrick R, Bacon P, Panella J, Robinson J, Nickoloff BJ 2003 *Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin.* Arch Pathol Lab Med 127:178–186.

16. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. 1997. *A peptide antibiotic from human skin.* Nature;387:861.

17. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, et al. 2002. *Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis.* N Engl J Med ;347:1151–60.

18. Bangert, C., P. M. Brunner, et al. 2011. *Immune functions of the skin.* Clinics in Dermatology 29(4): 360-376.

19. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H, et al. 1997. *The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders.* J Biol Chem ;272:15258–63.

20. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, et al. 2001. *Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection.* Nature;414:454-7.

21. López-García B, Lee PH, Yamasaki K, Gallo RL. 2005. *Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in Candida albicans skin infection.* J Invest Dermatol ;125:108-15.

22. Howell MD, Wollenberg A, Gallo RL, et al. 2006. *Cathelicidin deficiency predisposes to eczema herpeticum.* J Allergy Clin Immunol;117:836-41.

23. Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M. L. & Girolomoni, G. 2005. *Keratinocytes in inflammatory skin diseases.* Curr. Drug Targets Inflamm. 4, 329–334.

24. Arend, W. P., Palmer, G. & Gabay, C. 2008. *IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines.* Immunol. Rev. 223,20–38.

25. Geissmann, F., M. G. Manz, et al 2010. *Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells.* Science 327(5966): 656-661.

26. Novak, N. and T. Bieber . 2008. *Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance*. Journal of Allergy and Clinical Immunology 121(2): S370-S374.
27. Romani N et al 1989. *Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T-cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells*. J Exp Med 169:1169–1178.
28. Cella M et al 1999. *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat Med 5:919–923.
29. Lande, R., J. Gregorio, et al. 2007. *Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide*. Nature 449(7162): 564-569.
30. Iglesias D. L. *Tratado de dermatología*, EGRAF, Madrid, 2000, pp; 701-709 .
31. Proksch, E., Brandner, J. M. & Jensen, J. M. 2008. *The skin: an indispensable barrier*. Exp. Dermatol. 17, 1063–1072.
32. Krueger, G. G. & Stingl, G. 1989. *Immunology/inflammation of the skin — a 50-year perspective*. J. Invest.Dermatol. 92, 32S–51S.
33. Nestle, F. O., P. Di Meglio, et al. 2009. *Skin immune sentinels in health and disease*. Nat Rev Immunol. 9; 679-691
34. Robert, C. & Kupper, T. S. 1999. *Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance*. N. Engl. J. Med. 341,1817–1828.
35. Uthayakumar, S., Nandwani, R., Drinkwater, T., Nayagam, A. T.& Darley, C. R. 1997. *The prevalence of skin disease in HIV infection and its relationship to the degree of immunosuppression*. Br. J. Dermatol. 137, 595–598 .
36. Lugo-Janer, G., Sánchez, J. L. & Santiago-Delpin, E. 1991. *Prevalence and clinical spectrum of skin diseases in kidney transplant recipients*. J. Am. Acad. Dermatol. 24, 410–414.
37. Liu K, Nussenzweig C. M 2010. *Origin and development of dendritic cells*. Immunol. Rev. 234: 45–54.
38. Reis e Sousa, C. 2006. *Dendritic cells in a mature stage*. Nature Rev. Immunol. 6, 476–483.
39. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. 2003 *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol;21:685–711.
40. Johansson-Lindbom, B. et al. 2005. *Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing*. J. Exp. Med. 202,

1063–1073.

41. J. hereau, R.M. Steinman 1998. *Dendritic cells and the control of immunity*, Nature 392; 245–252.

42. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006 *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell;124:783–801.

43. Medzhitov R, Janeway Jr CA. 2002. *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. Science ;296:298–300.

44. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. 2002. *C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells*. Nat Rev Immunol ;2:77–84.

45. Martinon F, Tschopp J. 2005. *NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens*. Trends Immunol;26:447–54.

46. MacDonald, K. P. A. 2002. *Characterization of human blood dendritic cell subsets*. Blood 100(13): 4512-4520.

47. Schäkel K et al. 1998. *A novel dendritic cell population in human blood:one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes* Eur. J. Immunol. 28: 4084–4093.

48. Dua, B., R. M. Watson, et al. 2010. *Myeloid and plasmacytoid dendritic cells in induced sputum after allergen inhalation in subjects with asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology 126(1): 133-139.

49. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R 2001. *Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses*. Nat Immunol 2:947–950.

50. Steinman RM, Cohn ZA 1973 *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice*. J Exp Med 137:1142–1162.

51. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. 2001. *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. J Exp Med;194:863–9.

52. Schäkel K. et al 2002. *6-Sulfo LacNAc, a Novel Carbohydrate Modification of PSGL-1, Defines an Inflammatory Type of Human Dendritic Cells*. Immunity 17; 289–301.

53. Schäkel, K., M. von Kietzell, et al. 2006. *Human 6-Sulfo LacNAc-Expressing Dendritic Cells Are Principal Producers of Early Interleukin-12 and Are Controlled*

by Erythrocytes. *Immunity* 24(6): 767-777.

54. Hänsel A, Schäkel K. 2011. *Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses.* *J Allergy Clin Immunol*;127:787-94.

55. Jahnsen, F. L., Lund-Johansen, F., Dunne, J. F., Farkas, L., Haye, R. and Brandtzaeg, P., 2000. *Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy.* *J. Immunol.* 165: 4062–4068.

56. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. 1997. *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand.* *J Exp Med*;185:1101–1111.

57. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. 1999. *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood.* *Science*;284:1835–7.

58. Fitzgerald-Bocarsly, P., Dai, J., and Singh, S. 2008. *Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history.* *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 3–19.

59. Zarembek KA, Godowski PJ 2002. *Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines.* *J Immunol* 168:554–561.

60. Villadangos, J. A. and L. Young 2008. *Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells.* *Immunity* 29(3): 352-361.

61. Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, et al. 2002. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol*;182:6815–6823.

62. Valladeau, J. and S. Saeland 2005. *Cutaneous dendritic cells.* *Seminars in Immunology* 17(4): 273-283.

63. Renn CN, Sanchez DJ, Ochoa MT, Legaspi AJ, Krutzik SR, Sieling PA, Cheng G, Modlin RL 2006. *TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response.* *J Immunol* 177:298–305.

64. Fujita H, Asahina A, Mitsui H, Tamaki K 2004. *Langerhans cells exhibit low responsiveness to double-stranded RNA.* *Biochem Biophys Res Commun* 319:832–839.



65. Austyn JM 1996. *New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells.* J Exp Med 183(4):1287–1292.
66. Meunier L, Gonzalez-Ramos A, Cooper KD 1993. *Heterogeneous populations of class II MHC+ cells in human dermal cell suspensions. Identification of a small subset responsible for potent dermal antigen presenting cell activity with features analogous to Langerhans cells.* J Immunol;151:4067-80.
67. Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, et al 2010. *Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens.* J Exp Med;207:1247-60.
68. Angel, C. E. et al 2007. *CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts.* Int. Immunol. 19, 1271–1279.
69. Gilliet, M. et al. 2004. *Psoriasis triggered by Toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors.* Arch. Dermatol. 140, 1490–1495.
70. Nestle, F. O. 2005. *Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- $\alpha$  production.* Journal of Experimental Medicine 202(1): 135-143.
71. Yawalkar N, Tschanner GG, Hunger RE, Hassan AS 2009. *Increased expression of IL-12p70 and IL-23 by multiple dendritic cell and macrophage subsets in plaque psoriasis.* J Dermatol Sci;54:99–105.
72. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, et al 2009. *Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells.* J Invest Dermatol;129:79-88.
73. Chu, C.-C., P. Di Meglio, et al. 2011. *Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases.* Seminars in Immunology 23(1): 28-41.
74. Lowes, M. A. 2005. *Increase in TNF- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a).* Proceedings of the National Academy of Sciences 102(52): 19057-19062.
75. Zaba, L. C., J. G. Krueger, et al. 2008. *Resident and Inflammatory Dendritic Cells in Human Skin.* Journal of Investigative Dermatology 129(2): 302-308.
76. Vermi, W., S. Lonardi, et al. 2009. *Cutaneous distribution of plasmacytoid dendritic cells in lupus erythematosus. Selective tropism at the site of epithelial apoptotic damage.* Immunobiology 214(9-10): 877-886.

77. Jariwala, S. P. 2007. The role of dendritic cells in the immunopathogenesis of psoriasis. *Archives of Dermatological Research* 299(8): 359-366.
78. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al 2007. *Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis*. *Nature* ;445:648-51.
79. Teunissen B. M et al 1998. *Interleukin-17 and interferon gamma synergize in enhancement or proinflammatory cytokine production by human keratinocytes* *J Invest Dermatol* 111: 645-649.
80. Chung C. Y. et al. 2001. *Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis* *Trends Bio Sci* 26: 557-566.
81. Baggiolini M 1998. *Chemokines and leukocyte traffic*. *Nature* 392:565-569.
82. Gunn, M. D. 2003. *Chemokine mediated control of dendritic cell migration and function*. *Seminars in Immunology* 15(5): 271-276.
83. Zlotnik A. et al. 2000. *Chemokines: A new classification system and their role in immunity* *Immunity* 12:121-127.
84. Ayehunie S, Garcia-Zepeda EA, Hoxie JA, Horuk R, Kupper TS, Luster AD, et al. 1997 *Human immunodeficiency virus-1 entry into purified blood dendritic cells through CC and CXC chemokine coreceptors*. *Blood*;90:1379–86.
85. Balkwill, F. 2004. *The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4*. *Seminars in Cancer Biology* 14(3): 171-179.
86. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, et al. 1995 *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*. *Genomics*;28:495–500.
87. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, 1996. *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. *Nature*, 382:635–638
88. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, 1998. *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. *Nature*, 393:595–599.
89. Romagnani, P., L. Lasagni, et al. 2004. *CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis*. *Trends in Immunology* 25(4): 201-209.

90. Penna G, Sozzani S. 2001 *Usage of chemokine receptors by plasmacitoid dendritic cells.* J Immunol 167: 1862-1866.
91. Kabashima, K., K. Sugita, et al. 2007. *CXCR4 engagement promotes dendritic cell survival and maturation.* Biochemical and Biophysical Research Communications 361(4): 1012-1016.
92. Kabashima, K., N. Shiraishi, et al. 2007. *CXCL12-CXCR4 Engagement Is Required for Migration of Cutaneous Dendritic Cells.* The American Journal of Pathology 171(4): 1249-1257.
93. Ouwehand, K., S. J. A. M. Santegoets, et al. 2008. *CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis.* European Journal of Immunology 38(11): 3050-3059.
94. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, et al. 1994. *Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis.* J Exp Med;180:1141-6.
95. Salcedo R et al. 1999. *Vascular Endothelial Growth Factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells.* American Journal of Pathology, 154;4.
96. Frederick MJ, Clayman G 2001. *Chemokines in cancer.* Exp Rev Mol Med (01) 00330; 1-14