



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

**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LINFOCITOS TH17 EN PIEL  
DE PACIENTES CON PSORIASIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JOSÉ ALEJANDRO BASTIDA LÓPEZ**

**CD. DE MÉXICO**

**AÑO 2016**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>Profesor:</b>	RODOLFO PASTELÍN PALACIOS
<b>VOCAL:</b>	<b>Profesor:</b>	MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRÍA
<b>SECRETARIO:</b>	<b>Profesor:</b>	LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>Profesor:</b>	SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA
<b>2do. SUPLENTE:</b>	<b>Profesor:</b>	GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES “BERNARDO SEPÚLVEDA”, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.

## **ASESOR DEL TEMA:**

LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS

## **SUSTENTANTE:**

JOSÉ ALEJANDRO BASTIDA LÓPEZ

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>2</b>
<b>4. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>3</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>3</b>
<b>6. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
6.1. Generalidades.....	4
6.2. PASI.....	6
6.3. Epidemiología.....	8
6.4. Etiología.....	9
6.4.1. Factores genéticos.....	9
6.4.2. Factores ambientales.....	10
6.5. Patogénesis.....	11
6.5.1. Fase de sensibilización.....	12
6.5.1.1. Procesamiento y presentación de antígeno.....	12
6.5.1.2. Activación y diferenciación de células T.....	12
6.5.2. Fase efectora.....	15
6.5.2.1. Infiltración de células inmunes.....	15
6.5.2.2. Activación de células inmunes en piel.....	16
6.5.2.3. Respuesta de queratinocitos.....	17
6.6. Linfocitos Th17.....	19
6.6.1. Citocinas.....	20
6.6.2. Diferenciación.....	21
6.7. Linfocitos Th17 y autoinmunidad.....	23
6.8. IL-23 y la patogenicidad de las células Th17.....	24
6.9. Células Th17, factores diferencialmente expresados.....	25
6.9.1. IFN- $\gamma$ .....	25
6.9.2. IL-10.....	25

6.9.3. IL-21.....	26
6.9.4. GM-CSF.....	26
<b>7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>28</b>
7.1. Material biológico.....	28
7.2. Recuperación y activación de células inmunes infiltrantes.....	29
7.3. Tinción extracelular.....	30
7.4. Fijación.....	30
7.5. Tinción intracelular de factores de transcripción.....	31
7.6. Tinción extracelular de citocinas.....	31
7.7. Tinción intracelular de citocinas.....	32
7.8. Análisis por citometría de flujo.....	34
7.8.1. Linfocitos Th17.....	34
7.8.2. Citocinas extracelulares.....	36
7.8.3. Citocinas intracelulares.....	37
7.9. Análisis estadístico.....	38
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
8.1. Linfocitos Th17 totales.....	40
8.2. Linfocitos Th17 patogénicos.....	45
8.3. Linfocitos Th17 convencionales.....	48
8.4. Citocinas extracelulares.....	50
8.4.1. IL-17A e IL-22.....	50
8.4.2. INF- $\gamma$ .....	52
8.4.3. TNF- $\alpha$ .....	52
8.4.4. IL-10.....	54
8.4.5. IL-9.....	55
8.5. Citocinas intracelulares.....	56
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>66</b>
I. Consentimiento informado.....	66

II.	Preparación de soluciones.....	71.
III.	Abreviaturas.....	72.

## **1. RESUMEN**

La psoriasis es una enfermedad caracterizada por alteraciones cutáneas que afecta a alrededor de 125 millones de personas en todo el mundo y da lugar a un considerable deterioro de la calidad de vida de los pacientes afectados. El descubrimiento reciente de una población Th17 más patogénica y su presencia en las lesiones de procesos autoinmunes ha puesto en discusión su papel en el desarrollo de tales trastornos. A través del marcaje con anticuerpos y el análisis por citometría de flujo, se pudieron analizar las poblaciones celulares infiltrantes en piel de pacientes y controles, así como la expresión de citocinas tras la activación con superantígeno. Se pudo demostrar que los linfocitos Th17 patogénicos incrementan en las lesiones psoriásicas y en los pacientes con mayor grado de severidad, sin existir una correlación significativa; y que tras un estímulo de activación, la proporción de esta población celular incrementa. También se demostró, a través de la expresión de IFN- $\gamma$ , que el factor de transcripción T-bet es funcional en los linfocitos Th17 patogénicos. En cuanto al análisis de citocinas, se observó la disminución de los niveles de IL-9 en las lesiones psoriásicas, sugiriendo su relación con la severidad del padecimiento.

## **2. INTRODUCCIÓN**

El sistema inmune es una red interactiva de órganos linfoides, células, factores humorales y citocinas, cuya función esencial es la defensa del huésped contra microbios patógenos y la eliminación de tóxicos o sustancias alergénicas. <sup>(1, 2)</sup>

El sistema inmune ha evolucionado para responder a patógenos y no a los antígenos propios. El proceso para la producción aleatoria del receptor de antígeno conduce inevitablemente al desarrollo de receptores autoreactivos, sin embargo existen sistemas establecidos para inducir tolerancia a autoantígenos. El

fracaso de la tolerancia subyace en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. (1, 3)

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica y común de la piel, se caracteriza por lesiones rojizas, inflamadas y escamosas que pueden manifestarse en cualquier parte del cuerpo, afectando a hombres y mujeres de cualquier edad y generando una disminución en la calidad de vida del paciente. En un individuo genéticamente predispuesto, todos los elementos presentes en la dermis y epidermis, involucrados en el mantenimiento de la integridad de la barrera, se desregulan en respuesta a antígenos ambientales o propios, y aunque actualmente aún se desconoce el origen del antígeno primario, se considera un hecho que el sistema inmune juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. (4)

Se ha descrito una población de linfocitos Th17 que expresa diferentes factores de transcripción y citocinas, y cuya presencia se ha detectado en lesiones de trastornos autoinmunes, incluyendo a la psoriasis, lo que sugiere su participación en la patogénesis de la enfermedad. En el presente trabajo se evaluará la participación de esta población Th17 en psoriasis a través del análisis de las proporciones de células infiltrantes en la piel de pacientes, así como por la expresión de citocinas. Un mejor entendimiento del proceso patogénico conducirá al desarrollo de mejores tratamientos, a la detección temprana, e incluso a la prevención en sujetos susceptibles.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el fenotipo de las poblaciones de células Th17 infiltrantes en la piel lesionada y no lesionada de pacientes con psoriasis y evaluar las proporciones de células Th17 patogénicas, así como su funcionalidad a través de la expresión de citocinas.



#### **4. OBJETIVOS PARTICULARES**

Obtención de biopsias de piel con lesiones psoriásicas y de piel no lesionada de pacientes con psoriasis en placas y biopsias de piel control.

Extracción y activación de células inmunes infiltrantes en piel.

Tinción de las células inmunes infiltrantes en piel, identificación de la población de linfocitos Th17 y diferenciación del fenotipo patogénico a través de la expresión de factores de transcripción.

Cálculo de las proporciones de células Th17 patogénicas y convencionales.

Cuantificación de citocinas en el sobrenadante para la evaluación de las condiciones del microambiente celular en el sitio de inflamación y lesión.

Evaluación de la expresión de citocinas en células Th17 patogénicas mediante tinción intracelular.

Comparación estadística de los datos obtenidos entre las distintas condiciones experimentales: piel lesionada, sin lesión y control, grado de severidad y activación.

#### **5. HIPÓTESIS**

En la piel de pacientes con psoriasis se observará un incremento en las proporciones de linfocitos Th17 patogénicos, con los mayores porcentajes en piel lesionada, además existirá una correlación con el grado de severidad de la patología.

## 6. ANTECEDENTES

### 6.1. Generalidades

La psoriasis es una de las enfermedades humanas más comunes de la piel y en muchos casos es completamente reversible con la terapia adecuada. Se trata de una enfermedad autoinmune específica de órgano desencadenada por el sistema inmune celular activado. <sup>(5)</sup>

El término “psoriasis” incluye una gran variedad de apariencias clínicas, de las cuales actualmente hay pocos o ningún acuerdo sobre su clasificación, además las causas específicas para la variación en los patrones de la enfermedad son aún desconocidas. <sup>(6)</sup>

La psoriasis en placa (*psoriasis vulgaris*) es la forma más común de la condición (se presenta en alrededor del 90% de los pacientes) y por lo general a este tipo se refieren con el término “psoriasis”. Como consecuencia, la psoriasis en placa es la forma de la enfermedad que participa con mayor frecuencia en los ensayos clínicos y es el objeto de la mayoría de las investigaciones en la genética y la patogénesis de este trastorno. Los lugares más frecuentes para la aparición de las placas son: el lado extensor de las extremidades, la región sacra y la cabeza (Figura 1). <sup>(6)</sup>

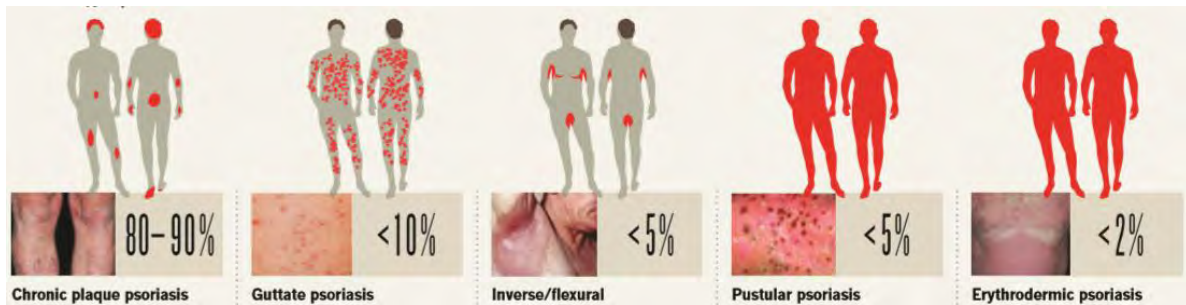


Figura 1. Variedades fenotípicas de psoriasis, frecuencia y zonas usuales de lesión. Modificada de (7).

Las placas psoriásicas se caracterizan por ser lesiones bien delimitadas, rojas y ligeramente elevadas con escamas plata-blanquecinas (Figura 2). Las alteraciones microscópicas incluyen infiltración de células inmunes en la dermis y epidermis, dilatación y aumento en el número de vasos sanguíneos en la dermis superior y un engrosamiento masivo de la epidermis con diferenciación atípica de queratinocitos (Figura 3). Las lesiones tienen a menudo forma de punto pequeño en el inicio, durante el curso de la enfermedad crecen y pueden afectar grandes extensiones de piel, o en casos muy graves cubrir todo el cuerpo. <sup>(6, 8)</sup>



Figura 2. Piel con lesiones psoriásicas. <sup>(9)</sup>

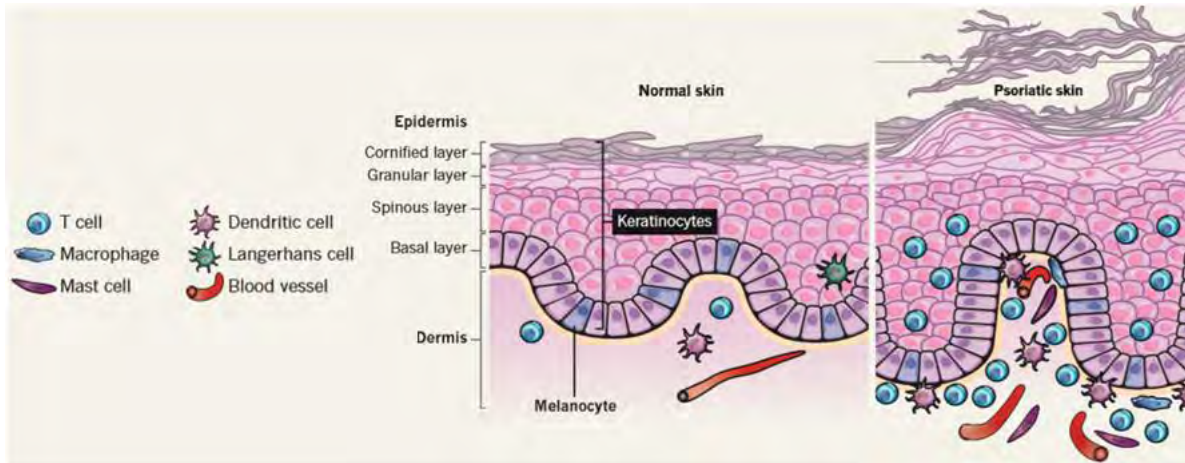


Figura 3. Alteraciones microscópicas en la piel lesionada con placas psoriásicas. Modificada de (7).

Además de la frecuencia de la enfermedad y la discapacidad de los pacientes, los investigadores se han concentrado en la psoriasis debido a que la patogénesis postulada para este trastorno es común a otras enfermedades inflamatorias crónicas mediadas por el sistema inmune. De hecho, reacciones similares son hipotetizadas para contribuir a la iniciación y mantenimiento de enfermedades tales como la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn, y se espera que una mejor comprensión de la patogénesis de la psoriasis ayude a la comprensión de otras enfermedades inflamatorias crónicas y conduzca a nuevas opciones de tratamiento.<sup>(8)</sup>

## 6.2. PASI

Una amplia variedad de sistemas de puntuación se han propuesto para evaluar la gravedad de la psoriasis. El índice de área y severidad de la psoriasis (PASI) tiene una larga historia de uso y es ampliamente aceptado como una medida en la investigación clínica. El PASI es la puntuación de severidad clínica de psoriasis más extensamente estudiada y la más completamente validada de acuerdo a los criterios de validación metodológica.<sup>(10)</sup>

El PASI evalúa la severidad de los síntomas: eritema, infiltración y descamación, así como el grado de participación de la cabeza, el tronco y las extremidades. Se usa una fórmula en la que se asigna a cada área un porcentaje de la superficie corporal total, se valora el eritema, la infiltración y la descamación en una escala de 0 a 4 y se determina la extensión de las lesiones en la zona determinada en un valor de 0 a 6 (Tabla 1).<sup>(11)</sup>

Tabla 1. Valores asignados para el cálculo de PASI.

% Superficie corporal		Síntomas (E/I/D)		Extensión de la lesión (S)	
Cabeza (c)	10	Leve	1	Ausencia	0
Extremidades superiores (s)	20	Moderado	2	<10%	1
Tronco (t)	30	Marcado	3	10 a <30%	2
Extremidades inferiores (i)	40	Grave	4	30 a <50%	3
				50 a <70%	4
				70 a <90%	5
				90 a <100%	6

La fórmula con la que se calcula el PASI viene dada por:

$$\text{PASI} = 0.1 (E_c + I_c + D_c) S_c + 0.2 (E_s + I_s + D_s) S_s + 0.3 (E_t + I_t + D_t) S_t + 0.4 (E_i + I_i + D_i) S_i$$

El valor resultante es un número comprendido entre 0 y 72. Hay un consenso europeo sobre la clasificación en la severidad de la psoriasis como: psoriasis leve, donde el PASI ≤ 10 y psoriasis moderada a severa siendo el PASI > 10.<sup>(11)</sup>

### 6.3. Epidemiología

La psoriasis es una enfermedad común que tiene una prevalencia general del 2% al 3% de la población mundial, con una mayor prevalencia en la población americana y canadiense (4.6% y 4.7%, respectivamente), comparada con 0.4%-0.7% en las poblaciones africana, afroamericana y asiática. <sup>(4)</sup> En México se estima una frecuencia de alrededor del 0.5% de la población general, encontrándose dentro de las primeras 15 causas de consulta de los servicios de dermatología. <sup>(9)</sup>

Henseler y Christophers identificaron dos subgrupos de acuerdo con las edades de inicio de la enfermedad. <sup>(12)</sup> La evidencia genética indica que estas formas pueden ser distinguidas de acuerdo a la asociación con genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I, más notablemente con HLA-Cw0602\*. La psoriasis tipo I (aproximadamente el 65% de los casos de psoriasis) es HLA-Cw0602\* positivo y se asocia con un grupo de pacientes más jóvenes (menores de 30 años), mientras que la tipo II es HLA-Cw0602\* negativo (35% de los pacientes con psoriasis) y parece estar relacionada con una población de edad avanzada (mayores de 40 años). El tipo I se asocia con un curso más grave de la enfermedad, antecedentes familiares de psoriasis e infección estreptocócica precedente. <sup>(4, 6)</sup>

Existen otros trastornos que se asocian con bastante frecuencia a la psoriasis, como son la artritis reumatoide, colitis, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus tipo II, obesidad, dislipidemia, infarto al miocardio, síndrome metabólico e hipertensión. En contraste, patologías como la dermatitis atópica y las alergias se ven asociadas con menos frecuencia. <sup>(4, 8)</sup>

La incidencia de psoriasis no se ha incrementado en los últimos 20 a 30 años y hombres y mujeres se ven afectados por igual. <sup>(8)</sup>

## 6.4. Etiología

La psoriasis es una enfermedad multifactorial en la que factores genéticos y ambientales juegan un papel importante en su patogénesis.

### 6.4.1. Factores genéticos

La disposición genética es clave en la susceptibilidad para desarrollar psoriasis. El riesgo es elevado cuando los familiares de primer grado padecen la enfermedad; alrededor del 20% si uno de los padres tiene psoriasis y alrededor del 75% si ambos padres están afectados. Si un gemelo monocigótico sufre de psoriasis, la probabilidad es de más del 55% de que el otro también se vea afectado. <sup>(8)</sup>

Se han descrito varios loci y genes de susceptibilidad a psoriasis (PSORS). El principal determinante genético se encuentra en un segmento conocido como PSORS1 en la región MHC en el cromosoma 6 (6p21) y parece estar asociada con la mayoría de los casos de psoriasis, implicando a HLA-C y su alelo HLA-Cw\*060 como el gen PSORS1 más probable; sin embargo su papel preciso en la patogénesis de la psoriasis es aún incierta. <sup>(4)</sup> Algunos genes de esta región también se asocian con otras enfermedades como artritis reumatoide, colitis y diabetes. <sup>(8)</sup>

Aunque el locus PSORS1 se cree que confiere el mayor riesgo para la psoriasis, se han identificado con éxito nueve segmentos adicionales (PSORS2-10) fuera del MHC, que están asociados con psoriasis. <sup>(4)</sup>

Otros nuevos genes vinculados con psoriasis han sido descubiertos, en particular, genes que pertenecen al eje IL-23/Th17, la vía de señalización del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y al complejo de diferenciación epidermal (EDC), lo que sugiere que estas vías están implicadas críticamente en el desarrollo de la psoriasis. <sup>(4)</sup>

#### 6.4.2. Factores ambientales

Sigue existiendo una pregunta que es crucial para la comprensión de la patogénesis de la psoriasis: ¿Cuál es el antígeno responsable del *priming* o estimulación inicial de la célula T en la mayoría de los pacientes? Aislando células T de lesiones de *psoriasis guttata* y de placas crónicas, y estableciendo líneas de células T, se pudo mostrar que éstas fueron reactivas frente a aislados de estreptococos. <sup>(13, 14)</sup> Un origen estreptocócico del antígeno primario estaría en concordancia con el hecho de que la primera manifestación, las recaídas y la agravación de la psoriasis a menudo están vinculadas a infecciones con estreptococos, especialmente a *Streptococcus pyogenes*  $\beta$ -hemolítico.

Aunque algunos de los componentes de estreptococos en la piel han sido reportados, estos antígenos parecen no persistir en las lesiones psoriásicas y no jugarían un papel en la activación de las células T inmigrantes. Ésto también es apoyado por el hecho de que el tratamiento antibiótico o la amigdalectomía rara vez mejoran el curso de la psoriasis. Una base atractiva para la resolución de esta discrepancia es el concepto de reactividad cruzada de las células T dirigidas principalmente contra antígenos estreptocócicos, con autoantígenos en la piel. Lo anterior puede ser posible ya que un cierto número de células T potencialmente autoreactivas parecen persistir en el organismo a pesar del proceso de selección negativa de células T en el timo. <sup>(8)</sup>

Las búsquedas iniciales en bases de datos identificaron altas similitudes estructurales entre las proteínas M de estreptococos, los principales factores de virulencia de estreptococos, y queratinas tipo I. <sup>(15)</sup> Varios estudios demostraron respuestas de células T de sangre periférica de pacientes con psoriasis, pero no de participantes sanos, a varios péptidos sintéticos correspondientes a secuencias de motivos compartidos en las proteínas M y queratinas tipo I. <sup>(16, 17)</sup>



A pesar de que todas las queratinas tipo I comparten similitud significativa de secuencia, la queratina 17 (K17) parece ser el candidato preferido para el autoantígeno relevante en la psoriasis. En condiciones normales, K17 se expresa solamente en los folículos pilosos, cutículas, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas. Su expresión es inducida en los queratinocitos suprabasales en las lesiones psoriásicas. <sup>(18)</sup> In vitro, la expresión de K17 puede ser inducida en la línea celular de queratinocitos HaCaT por IFN- $\gamma$  y en menor medida por TGF- $\alpha$  <sup>(19,20)</sup>.

El curso de la enfermedad es crónico, por lo que la intensidad y recurrencia de las lesiones son muy diferentes entre los pacientes, y a veces en el mismo paciente. Nuevas exacerbaciones de lesiones psoriásicas pueden ser provocadas por infecciones (virales o bacterianas); por trauma físico, tatuajes o incisiones quirúrgicas, dando lugar al fenómeno de Koebner que consiste en la aparición de nuevas lesiones en los lugares que son mecánicamente irritados; o por ciertos medicamentos ( $\beta$ -bloqueadores, litio, cloroquina, antiinflamatorios no esteroideos, tetraciclinas e interferones). <sup>(8)</sup>

Además de estreptococos, infecciones por *Staphylococcus aureus* también se consideran factores que desencadenan y agravan la psoriasis. Se ha demostrado que superantígenos de *Staphylococcus aureus* generan un incremento en la hipereactividad de sangre periférica de pacientes con psoriasis y se sugiere que éstos pueden conducir a la exacerbación y persistencia de la psoriasis. <sup>(21)</sup>

## 6.5. Patogénesis

La aparición de la enfermedad es similar a una reacción inmune que se compone de tres fases: una fase de sensibilización, una fase de silencio de longitud variable y una fase efectora. <sup>(8)</sup>

### 6.5.1. Fase de sensibilización

#### 6.5.1.1. Procesamiento y presentación de antígeno

La fase de sensibilización comprende la captura del antígeno por las células dendríticas (CDs) inmaduras a través de la vía exógena, que comienza por endocitosis o fagocitosis. Las CDs sufren un proceso de maduración si se encuentran en condiciones inflamatorias (debido a citocinas como TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ ) o debido a productos microbianos que las estimulan a través de receptores tipo Toll (TLR). El antígeno es procesado a péptidos en compartimentos endosomales/lisosomales especializados y es cargado al MHC II para su presentación en la superficie celular. Las CDs activadas aumentan la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 en su superficie y migran a la zona de células T de los nódulos linfáticos regionales a través de los vasos linfáticos aferentes, siguiendo un gradiente de CCL21 y CCL19 (ligandos de CCR7). <sup>(2, 8)</sup>

El complejo MHC II-péptido en la superficie de la CD puede ser reconocido por las células T CD4<sup>+</sup> a través del receptor de células T (TCR). Las CDs, además de la presentación de antígenos del medio extracelular a través de la vía del MHC II, están dotadas con la capacidad de presentar esos antígenos en el MHC I, conduciendo a la adicional activación de células T CD8<sup>+</sup>. <sup>(2, 8)</sup>

#### 6.5.1.2. Activación y diferenciación de células T

Las células T naïve circulan permanentemente entre la sangre y órganos linfáticos secundarios. La conversión de células naïve a células T efectoras y de memoria se produce en los órganos linfáticos secundarios bajo la orientación de las CDs. Una célula T naïve CD4<sup>+</sup>, cuyo TCR tenga una afinidad suficientemente alta por el complejo MHC II-péptido, interactuará con la respectiva CD y formará la denominada sinapsis inmunológica que conduce a la activación de la célula T a

través de tres señales dadas por: i) la interacción entre el TCR y complejo MHC II-péptido, ii) moléculas coestimuladoras y iii) mediadores solubles. <sup>(8, 22)</sup>

Las principales moléculas coestimuladoras de células dendríticas son CD80 y CD86 que interactúan con CD28 y CD152 (CTLA-4); y CD40, que se une al ligando de CD40 en células T. <sup>(1)</sup>

La sinapsis inmunológica es estabilizada por moléculas de adhesión expresadas por CDs y células T. Entre las más importantes son las interacciones de (i) CD54 (ICAM-1) (CD) con CD11a/CD18 (LFA-1) (células T) y (ii) CD58 (LFA-3) (CD) con CD2 (células T). <sup>(1)</sup>

Las células T naïve CD4<sup>+</sup> activadas pueden polarizarse a diversos linajes de células T efectoras y de memoria; las citocinas presentes en el microambiente al momento de la activación son las responsables de influenciar esta polarización (Tabla 2). <sup>(23)</sup>

Tabla 2. Polarización de las poblaciones de células T y su participación en la inmunidad.

<b>Tipo celular</b>	<b>Inductor primario</b>	<b>Factores de transcripción</b>	<b>Relevancia</b>	<b>Citocinas secretadas</b>
<b>Th1</b>	IL-12, IFN- $\gamma$	STAT-1, STAT-4, T-bet	Patógenos intracelulares.	IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-22, IL-26, GM-CSF, TNF- $\beta$
<b>Th2</b>	IL-4	STAT-6, GATA-3	Inmunidad humoral. Respuestas alérgicas. Parásitos extracelulares.	IL-4, IL-5, IL-13
<b>Th17</b>	IL-6, TGF- $\beta$ , IL-23	STAT-3, Ror $\gamma$ t	Inmunidad de la mucosa. Enfermedades autoinmunes.	IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21, IL-22
<b>Treg</b>	IL-2, TGF- $\beta$	FoxP3	Supresión de la respuesta inmune.	IL-10, TGF- $\beta$

(23, 24, 25)

Independiente de su polarización, una célula T naïve activada con éxito se puede diferenciar a una célula T efectora que inmediatamente viaja al tejido inflamado, realiza sus funciones efectoras y muere; a una célula T de memoria efectora, la cual recircula entre la sangre y los tejidos periféricos produciendo rápidamente citocinas efectoras tras la restimulación, pero con una pobre capacidad proliferativa; o bien, a una célula T de memoria central que recircula principalmente entre la sangre y los ganglios linfáticos, con limitadas funciones efectoras, pero con gran capacidad de proliferar y diferenciarse en efectoras después de la estimulación secundaria. Un subconjunto de células T activadas con

éxito expresan el llamado antígeno linfocitario cutáneo (CLA) que guía a los leucocitos a la piel inflamada. <sup>(8)</sup>

## **6.5.2. Fase efectora**

### 6.5.2.1. Infiltración de células inmunes

Las células endoteliales juegan un papel importante en el paso de los leucocitos desde los vasos sanguíneos hacia el tejido inflamado. Los leucocitos ruedan a lo largo de la pared del vaso sanguíneo y reducen su velocidad de flujo por su interacción con las P- y E-selectinas. Las células inmunes reconocen quimiocinas, se activan y forman adherencias estrechas con las células endoteliales por la interacción de las integrinas y sus ligandos. La migración de las células inmunes fuera de los capilares (diapédesis) también es dependiente de las integrinas y se realiza a través de los poros formados entre las células endoteliales. <sup>(8)</sup>

Una pequeña cantidad de células T periféricas también migra a la piel no inflamada. Lowes y colaboradores mostraron que en la piel psoriásica sin lesión el número de células T es mayor que en la piel de participantes sanos. <sup>(26)</sup>

En las lesiones psoriásicas de la piel, células T CD8<sup>+</sup> están presentes principalmente en la epidermis, mientras que las células T CD4<sup>+</sup> están principalmente en la dermis. <sup>(27, 28)</sup> Los diferentes patrones de localización anatómicos son causados por la variada expresión de quimiocinas, integrinas y sus receptores.

En piel psoriásica lesionada se demostraron niveles elevados de IL-17 <sup>(29)</sup>, lo que sugirió la importancia de esta citocina y la participación de células productoras de IL-17 para el desarrollo de psoriasis. Más recientemente, se identificaron células Th17 en la dermis de pacientes con psoriasis y se observó un incremento de

ARNm de IL-17, IL-22 e IFN- $\gamma$  en piel lesionada, en comparación con la piel sin lesión. <sup>(30)</sup> El descubrimiento del polimorfismo de un sólo nucleótido en el gen del receptor de IL-23 y su asociación con psoriasis apoyó la participación de las células Th17 en la patogénesis de este trastorno. <sup>(31)</sup>

#### 6.5.2.2. Activación de células inmunes en piel

Las células T pueden activarse después de la migración a la piel y proliferar como consecuencia de la activación. En la dermis y epidermis existen diferentes poblaciones de células presentadoras de antígeno (CPA), como los macrófagos y diversos tipos de CDs, que pueden estimular a las células T y viceversa. Las citocinas (en particular, IL-23 e IL-6) producidas por estas CPA juegan un papel dominante en la activación de Th17. De hecho, las CDs convencionales y en particular los monocitos/macrófagos separados de las lesiones psoriásicas aumentaron su expresión de IL-23. <sup>(32)</sup>

Además, las células T que han migrado a la epidermis pueden ser activadas por los queratinocitos, los cuales han demostrado ser capaces de expresar moléculas MHC de clase II e ICAM-1 después de la exposición a IFN- $\gamma$ . <sup>(33)</sup>

La activación de las células T en la piel puede ser inhibida por dos subpoblaciones de células T. En piel normal de ratón, y también en bajas cantidades en piel humana, se pueden encontrar células T intraepiteliales que expresan el TCR  $\gamma\delta$  y a menudo muestran menor variabilidad de TCR, comparado con las células que expresan el TCR  $\alpha\beta$ . La segunda subpoblación de células T que pueden inhibir a las células Th17 y Th1 son las células T reguladoras (Treg). Datos demuestran que estas células son disfuncionales en los pacientes con psoriasis; células Treg obtenidas a partir de sangre periférica y de placas psoriásicas en pacientes con psoriasis tuvieron una actividad supresora deficiente. <sup>(34)</sup>

### 6.5.2.3. Respuesta de queratinocitos.

Los queratinocitos se pueden activar durante el inicio de las lesiones psoriásicas principalmente por mediadores producidos por las células Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-22). Sin embargo, se postula que con el paso del tiempo los mediadores de las células Th17 (IL-6, IL-17 e IL-22), de los macrófagos y CD<sub>s</sub> (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18, IL-19 e IL-20), y por último, mediadores producidos por los mismos queratinocitos, tales como TGF- $\alpha$ , el factor de crecimiento nervioso (NGF), IL-19, IL-20, así como los producidos por células del estroma en la dermis, como el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento similar a insulina 1 y factor de crecimiento de fibroblastos 10, son cada vez más importantes. <sup>(8)</sup>

La activación de los queratinocitos conduce al aumento de su proliferación y a la alteración de su maduración. Por otra parte, los queratinocitos activados producen una variedad de mediadores que pueden causar aumento de la inmigración de células inmunes, activación de células del estroma en la dermis e inducción de angiogénesis.

IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  son inhibidores de la proliferación de los queratinocitos. A pesar del aumento de IFN- $\gamma$  en las lesiones, esta citocina no desempeña su papel inhibitorio. Jackson y colaboradores demostraron que los queratinocitos psoriásicos muestran una señalización anormal en la vía IFN- $\gamma$ . <sup>(35)</sup>

Los impresionantes efectos terapéuticos de la neutralización de TNF- $\alpha$  en la psoriasis colocan a esta citocina como la responsable indirecta de la proliferación de queratinocitos. Siendo los macrófagos de la dermis papilar la principal fuente de TNF- $\alpha$  en la piel psoriásica, se demostró en modelos murinos que los macrófagos activados son esenciales para la inflamación crónica de piel similar a psoriasis. <sup>(36, 37)</sup>

TNF- $\alpha$  es capaz de inducir a TGF- $\alpha$  en los queratinocitos, y éste a su vez la expresión de su propio gen. TGF- $\alpha$  se sabe que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico para estimular la proliferación de los queratinocitos y acelerar la regeneración epidérmica. <sup>(38)</sup> Se ha demostrado que el ARNm de TGF- $\alpha$  y la proteína son mucho más abundantes en la epidermis psoriásica lesionada que en la epidermis no lesionada de los pacientes con psoriasis y la epidermis de piel normal. <sup>(39, 40)</sup>

En la piel normal la maduración de los queratinocitos a partir la capa basal a la capa córnea toma aproximadamente 28 días; en las lesiones psoriásicas la maduración se acorta a 5 días. Esta maduración más corta es asociada con una diferenciación terminal masivamente perturbada que se refleja principalmente por paraqueratosis. La retención de los queratinocitos parcialmente diferenciados causan las típicas escamas psoriásicas. <sup>(8)</sup>

La IL-20 e IL-22 son los principales mediadores que alteran la diferenciación terminal de los queratinocitos psoriásicos. La principal fuente de IL-22 pueden ser las células Th1, Th17 y las células linfoides innatas (ILC), en especial del grupo 3 (ILC-3), que están implicadas en la homeostasis. IL-22 regula tres funciones en los queratinocitos: (i) producción de proteínas antimicrobianas, (ii) migración, y más importante para la patogénesis de la psoriasis, (iii) regula la diferenciación terminal de los queratinocitos. <sup>(8, 41)</sup>

Se postula que la IL-20 tiene efectos similares a los de la IL-22, ya que actúan a través de receptores similares. Curiosamente, el TNF- $\alpha$  aumenta la sensibilidad de los queratinocitos a IL-20 <sup>(42)</sup>, y polimorfismos de un sólo nucleótido en el gen de IL-20 están asociadas con la psoriasis. <sup>(43)</sup>



IL-20 e IL-22 activan STAT3 en los queratinocitos. Ratones que transgénicamente expresan una variante constitutivamente activa de STAT3 en queratinocitos han demostrado desarrollar alteraciones de la piel parecidas a psoriasis. <sup>(44)</sup>

Otras características de las lesiones psoriásicas son la dilatación y el aumento del número de vasos sanguíneos dérmicos. Durante la dilatación, productos del complemento y TNF- $\alpha$  desempeñan un papel importante. La angiogénesis es probablemente dependiente del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la angiopoietina 2. <sup>(8)</sup>

Los macrófagos también pueden desempeñar un cierto papel en la angiogénesis por la liberación de proteasas, factores de crecimiento (factor de crecimiento de fibroblastos, GM-CSF, TGF- $\alpha$ , IGF-I, PDGF y VEGF) y otras citocinas. <sup>(45)</sup>

## **6.6. Linfocitos Th17**

Los linfocitos Th17 han demostrado ser fuertes inductores de inflamación en tejidos y enfermedades autoinmunes a través de la secreción de varias citocinas inflamatorias, incluyendo IL-17A (IL-17), IL-17F, IL-21 e IL-22, citocinas implicadas en la neutrofilia, remodelación y reparación de los tejidos y la producción de proteínas antimicrobianas. <sup>(46)</sup>

A través de la identificación de sus factores de diferenciación, IL-6 y TGF- $\beta$ 1, así como de su factor de transcripción, ROR $\gamma$ t, las células Th17 fueron clasificadas como un subconjunto de células T cooperadoras independientes. <sup>(23, 47)</sup> Bettelli y colaboradores, y Veldhoen y colaboradores, simultáneamente, describieron a estas citocinas como factores cruciales para la generación de células Th17 a partir de células T CD4<sup>+</sup> naïve. <sup>(48, 49)</sup>

Las células Th17 se identifican ahora como potentes inductores de la autoinmunidad. Células Th1 se presentan comúnmente junto con las células Th17 en los tejidos inflamados, pero la interacción entre las células Th1 y Th17 durante la enfermedad autoinmune es todavía poco clara. <sup>(23)</sup>

### **6.6.1. Citocinas**

IL-17: Es la citocina Th17 mejor estudiada. La familia de la IL-17 contiene seis isoformas: IL-17A (generalmente llamada IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) y la IL-17F, que promueven la inflamación del tejido a través de la inducción de otras citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas. <sup>(23)</sup>

IL-17A e IL-17F son los más estrechamente relacionados, ya que poseen 55% de homología entre sí. Debido a sus similitudes estructurales y funcionales, y al hecho de que ambos son producidos por las células Th17, IL-17A e IL-17F se han estudiado y caracterizado más a fondo. Ambos son activos como homodímeros, y recientemente se han identificado heterodímeros IL-17A/IL-17F. Homodímeros IL-17A son los más potentes en comparación con los heterodímeros de IL-17A / F y los homodímeros de IL-17F. <sup>(50)</sup>

Los receptores de IL-17 incluyen IL-17R(A-D). Los ejemplos mejor estudiados de células que expresan el receptor para IL-17A (IL-17RA, IL-17RC) son células epiteliales, células endoteliales vasculares, queratinocitos y fibroblastos, que responden a la señalización mediada por IL-17R con la producción de G-CSF, quimiocinas CXC (CXCL1, 2, 5, 8), proteínas antimicrobianas e IL-6, que median la granulopoyesis, el reclutamiento de neutrófilos y las respuestas inflamatorias. Los macrófagos y las células dendríticas también expresan IL-17RA y responden a la IL-17 mediante la producción de citocinas y quimiocinas. IL-17F tiene efectos similares a los de IL-17A, pero es menos potente. <sup>(22, 51)</sup>

IL-22: Miembro de la subfamilia de IL-10, activa a STAT3 en células mesangiales renales y queratinocitos. Su receptor consta de dos subunidades, IL-22R1 e IL-10R2. IL-10R2 se expresa ampliamente en las células inmunes (T, B y células NK), a diferencia de IL-22R1. <sup>(22)</sup> Wolk y colaboradores, demostraron que la expresión de IL-22R1 está presente en una variedad de tejidos no inmunes: la piel, los pulmones, el intestino delgado, hígado, colon, riñón y páncreas. <sup>(52)</sup> En la piel, la IL-22 puede causar acantosis e hiperproliferación de queratinocitos, por lo tanto, la IL-22 puede ser importante en la reparación epitelial durante la infección, así como en aumentar la función de barrera. IL-22 también puede actuar en sinergia con la IL-17 para aumentar la expresión de péptidos antimicrobianos. <sup>(22)</sup>

IL-17 e IL-22 pueden ser coexpresadas por células Th17, así como por células T  $\gamma\delta$ , células NK e ILC3. Además de IL-23R, las células Th17 también expresan altos niveles de IL-1R1 y TLR2, y por lo tanto, la IL-1 $\beta$  y ligandos de TLR2 pueden activar a estas células para producir IL-17 e IL-22. <sup>(22, 41)</sup>

IL-21: Recientemente IL-21 ha sido identificado como un mediador para la diferenciación y función Th17 de una manera autocrina. La IL-21R no se expresa sólo en células Th17, sino en una variedad de células tales como linfocitos B, NK y CD4, resultando en efectos pleiotrópicos para IL-21. <sup>(22, 51)</sup>

IL-9: Ha mostrado ser una citocina pleiotrópica con funciones clave en la inflamación y tolerancia. Se han identificado varios subconjuntos de células que la producen, incluidos: Th2, Th9, Th17, Treg e ILC2. <sup>(41, 53)</sup>

### **6.6.2. Diferenciación**

El factor de transcripción ROR $\gamma$ t es esencial para inducir la diferenciación de las células Th17. En ratones deficientes de ROR $\gamma$ t, las células T naïve no fueron capaces de diferenciarse en células Th17 y no mostraron respuesta a la inducción

con IL-23. Estos ratones también fueron resistentes a la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Los genes diana de ROR $\gamma$ t no se han caracterizado completamente y el mecanismo para la producción de IL-17 por ROR $\gamma$ t sigue siendo desconocido. <sup>(23)</sup>

La inducción de ROR $\gamma$ t es dependiente de STAT3. Activado por IL-6, IL-21 e IL-23, STAT3 es reconocido como esencial para la producción de IL-17 en ratón y células humanas. STAT3 se une y regula a varios genes que contribuyen al fenotipo Th17 incluyendo los locus IL17, IL21 e IL23R. STAT3 también se une a los genes que codifica factores de transcripción que son cruciales para la diferenciación a Th17, incluyendo *Rorc* (que codifica ROR $\gamma$ t), IRF4, Batf y Nfibiz. La importancia de STAT3 se ilustra claramente en los seres humanos con síndrome de hiper-IgE. Estos individuos carecen del desarrollo de células Th17 eficientes y sufren infecciones con ciertas bacterias y hongos. <sup>(46, 54)</sup>

STAT3, IRF4 y BATF son necesarios para la expresión de ROR $\gamma$ t en células Th17, además cada uno contribuye en cooperación con ROR $\gamma$ t a la expresión de IL-17 y de otros componentes clave del programa Th17. <sup>(46)</sup>

ROR $\gamma$ t también ha demostrado interactuar con el factor de transcripción RUNX1. RUNX1 puede participar en la mediación de la activación de señales de citocinas proinflamatorias. La unión del complejo ROR $\gamma$ t-RUNX1 al promotor IL17a conduce a una mayor producción de IL-17. <sup>(23)</sup>

FOXP3 puede actuar como un regulador negativo de la transcripción de las células Th17. FOXP3 es capaz de suprimir la diferenciación de células Th17 a través del antagonismo en la actividad de ROR $\gamma$ t; además FOXP3 puede interactuar e inhibir a RUNX1. <sup>(23)</sup>

La señalización de IL-6 a través de STAT3 es crucial tanto para la expresión del receptor de IL-23, como para la inducción de IL-17A e IL-17F; defectos en la señalización de IL-6 está asociada con un bloqueo más profundo en el desarrollo de EAE, lo que sugiere que la IL-23 tiene efectos más allá de la simple promoción de la producción de IL-17. <sup>(54)</sup>

### **6.7. Linfocitos Th17 y autoinmunidad**

Las células Th17 tienen funciones cruciales en la defensa del huésped, respuestas desreguladas median una variedad de condiciones autoinmunes e inflamatorias. Se ha detectado un aumento de los niveles de IL-17 en múltiples modelos autoinmunes en animales, así como en pacientes humanos de varios síndromes de enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, colitis inflamatoria, artritis reumatoide y psoriasis. En la artritis reumatoide las células Th17 pueden inducir metaloproteasas y estimular osteoclastos, lo que conduce a la destrucción del cartílago y hueso. Ratones deficientes de IL-17 o ratones tratados con un antagonista del receptor de IL-17 son resistentes al desarrollo de la artritis. De manera similar, ratones deficientes de IL-17 muestran retraso en la aparición y reducción de la severidad en la EAE. La evidencia también demostró que las células Th17 estaban involucradas en la patogénesis de la colitis y son capaces de inducir la EAE cuando se transfieren adoptivamente en ratones vírgenes de tipo silvestre. En la enfermedad inflamatoria intestinal crónica las células Th17 parecen ser esenciales para la inducción de la ruptura de las barreras epiteliales intestinales, y una vez inducidas, las células Th17 conducen a la inmunopatología e inflamación del tejido *in vivo*. Estos datos apoyan la noción de que las células Th17 productoras de IL-17 juegan un papel importante en la inducción y propagación de enfermedades autoinmunes. <sup>(8, 23, 55)</sup>

## 6.8. IL-23 y la patogenicidad de las células Th17

La IL-23, producida por las células dendríticas, es una citocina heterodimérica (p40/p19) que comparte la subunidad p40 de IL-12 (p40/p35) y se ha identificado como la citocina crucial en la patología asociada a Th17. <sup>(56)</sup> La IL-23 claramente no es necesaria para la inducción inicial de las células Th17, sin embargo se ha descrito por varios grupos ser esencial para el mantenimiento o estabilización del fenotipo, además se ha visto que el eje IL-23/Th17 tiene un fuerte impacto en la patogenicidad de enfermedades autoinmunes. <sup>(23, 47)</sup> La inactivación selectiva del componente p19 de IL-23, o del receptor de IL-23, resulta en pérdida de la manifestación de enfermedades autoinmunes, aumento en la susceptibilidad a infecciones con patógenos en las mucosas y la marcada reducción en el número de CD4<sup>+</sup> Células T que expresan IL-17 e IL-22. <sup>(46)</sup>

La conexión entre la IL-23 humana y la autoinmunidad se ha fortalecido por la considerable evidencia genética que vincula los polimorfismos del IL23R con la susceptibilidad a una gama de enfermedades autoinmunes, incluyendo: enfermedad de Crohn, espondiloartropatía, enfermedad tiroidea autoinmune, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis psoriásica, anemia aplásica adquirida y la enfermedad de Behcet. La IL-23 activa a la quinasa Janus 2 y a STAT3; polimorfismos de los genes que codifican estas moléculas de señalización también están vinculados a la autoinmunidad humana. <sup>(54)</sup>

Recientemente se identificó una población de células Th17 "alternativas" que se diferencian en presencia de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23 y ausencia de TGF- $\beta$ ; estas células poseen un diferente perfil de expresión de citocinas, factores de transcripción y moléculas de superficie. Al ser comparadas con las células Th17 "clásicas" (las inducidas por TGF- $\beta$ /IL-6), resultaron ser más patogénicas. <sup>(47, 54)</sup>

## **6.9. Células Th17 patogénicas, factores diferencialmente expresados**

### **6.9.1. IFN- $\gamma$**

Una característica de las células Th17 patogénicas es la expresión de T-bet e IFN- $\gamma$ , dependiente de IL-23, pero inhibida por TGF- $\beta$ .<sup>(47)</sup>

Las células dobles positivas IL-17<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (Th17 patogénicas) están enriquecidas en los órganos diana de varios modelos de enfermedades autoinmunes<sup>(57, 58)</sup>, y puesto que animales deficientes de T-bet están protegidos en los mismos modelos de la enfermedad, sugiere que estos dobles positivos son particularmente patógenos en la inflamación de tejidos y la autoinmunidad.<sup>(59)</sup> Estudios iniciales muestran que el IFN- $\gamma$  no es necesario para la patogenicidad de las células Th17, pues las células Th17 IFN- $\gamma$  deficientes son igualmente patógenas como sus homólogos productores de IFN- $\gamma$ .<sup>(47)</sup>

Ha sido mostrado que T-bet inhibe la expresión de ROR $\gamma$ t por secuestro del factor de transcripción RUNX-1, lo que explica porque las dobles positivas tienen menor expresión de ROR $\gamma$ t comparado con las simples positivas productoras de IL-17.<sup>(60)</sup>

### **6.9.2. IL10**

IL-10 puede limitar la inflamación inducida por Th17 en varios niveles. Se ha demostrado que la IL-10 puede ser producida directamente por las células Th17 y también por Treg FoxP3<sup>+</sup> y células Tr-1. Además, Huber y colaboradores demostraron que las células Th17 expresan niveles más elevados de IL-10R $\alpha$ , en comparación con células Th1, y que su proliferación se suprime preferencialmente por la señalización de IL-10.<sup>(61)</sup>

La exposición de las células Th17 al TGF- $\beta$  promueve la producción de IL-10, mientras que IL-23 la disminuye. En ausencia de IL-23 las células Th17 pueden eventualmente comenzar a producir IL-10 con el fin de restringirse a sí mismos y evitar la destrucción innecesaria del tejido. La reducción en la producción de IL-10 en células Th17 alternativas puede explicar en parte el aumento de la patogenicidad.<sup>(47)</sup>

### **6.9.3. IL-21**

Se sabe que las células Th17 producen IL-21 y dependen de ello para su autoamplificación, además IL-21 es importante para la expansión/diferenciación de células Tr-1, lo que puede limitar la expansión de las células Th17. La expresión de IL-21 e IL-10 es impulsado por el factor de transcripción c-Maf que es más altamente expresado en las células Th17 clásicas en comparación con las patogénicas. T-bet es conocida por regular negativamente a la IL-21, por lo tanto, IL-21 se asocia con células Th17 clásicas que son más reguladas. En apoyo de esta hipótesis, se ha demostrado que ratones deficientes de IL-21R desarrollan EAE exacerbado.<sup>(47)</sup>

### **6.9.4. GM-CSF**

Otro factor que es diferencialmente expresado entre ambas poblaciones Th17 es GM-CSF, crucial para la patogenicidad de las Th17 alternativas. El GM-CSF no se produce exclusivamente por las células Th17, sino también por otros subconjuntos de células T, incluyendo las células Th1.<sup>(47)</sup>

El-Behi y colaboradores demostraron que el TGF- $\beta$  suprime la producción de GM-CSF en células Th17, mientras que la IL-1 $\beta$ , y especialmente la IL-23, conducen a la producción de GM-CSF, que en un bucle de retroalimentación positiva estimula a las células presentadoras de antígeno para producir más IL-23.<sup>(62)</sup> También



Codarri y colaboradores demostraron que las células T antígeno específico tratadas con IL-23 son patógenas, incluso en ausencia tanto de IL-17 e IFN- $\gamma$ , debido a su producción de GM-CSF. <sup>(63)</sup>

A pesar de que el mecanismo molecular para la GM-CSF no está identificado, ahora es claro que GM-CSF contribuye en gran medida a la patogenicidad de las células Th17 alternativas. GM-CSF no sólo induce a las células presentadoras de antígeno para producir citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-6 e IL-23, y de ese modo promover la maduración/supervivencia y generación de *novο* de las células Th17, sino que también atrae una ola de células secundarias infiltrantes, principalmente macrófagos, que a continuación amplifican el proceso inflamatorio y promover la inflamación del tejido. Por lo tanto, el aumento en la producción de GM-CSF puede explicar en parte por qué las células Th17 alternativas son más difíciles de regular. <sup>(47)</sup>

Tabla 3. Comparativo de la expresión de factores de transcripción y citocinas en las poblaciones de células Th17 convencionales y patogénicas ( $\uparrow$  o  $\downarrow$  indican un aumento o disminución de la expresión respectivamente).

<b>Factores de transcripción/citocinas</b>	<b>Th17 convencionales</b>	<b>Th17 patogénicos</b>
ROR $\gamma$ t	Sí	Sí
RUNX-1	Sí	Sí
T-bet	No	Sí
c-Maf	Sí	$\downarrow$
IL-17	Sí	Sí
IFN- $\gamma$	No	Sí
IL-10	Sí	$\downarrow$
IL-21	Sí	$\downarrow$
GM-CSF	Sí	$\uparrow$

## 7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 7.1. Material biológico

Se extrajeron biopsias de piel de pacientes con diagnóstico confirmado de psoriasis, procedentes del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua; tales pacientes dieron su consentimiento para participar en el estudio y cumplieron con los siguientes criterios.

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico clínico e histológico de psoriasis en placas, PASI indistinto.
- Edad entre 18 y 80 años, sexo indistinto.

Criterios de exclusión:

- Psoriasis clasificada en otras variedades.
- Tratamiento tópico en los 15 días previos al estudio o tratamiento sistémico en el último mes.
- Proceso infeccioso 6 semanas previas a la toma de muestras.
- Embarazo o en periodo de lactancia.
- Pacientes portadores del virus de inmunodeficiencia humana.

Los procedimientos a realizar fueron explicados detalladamente a los pacientes y proporcionados por escrito en un consentimiento informado (Anexo I).

De cada paciente se obtuvieron muestras de piel, una con lesiones psoriásicas y otra de una zona cercana de piel no lesionada. La muestra de piel lesionada se extrajo por corte con bisturí sobre una placa accesible y representativa de la

gravedad del padecimiento, con un tamaño aproximado de 1 cm de largo y 0.5 cm de ancho. La muestra de piel no lesionada se obtuvo por punción con un diámetro de 6 mm. Estos procedimientos fueron realizados por un médico.

Las muestras de piel del grupo control provinieron de individuos sin afección dermatológica del Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Las biopsias se lavaron en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) y se retiró el tejido adiposo. La piel libre de grasa se incubó en 3.6 mL de medio RPMI-1640 suplementado (Anexo II) y 0.4 mL de dispasa II (10 mg/mL) (Roche) durante 15 horas a 4°C y 1 hora a 37°C para separar la epidermis. Una vez separadas, se incubaron en 4 mL de medio RPMI-1640 suplementado durante 6 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para favorecer la salida de las células inmunes al medio.

## **7.2. Recuperación y activación de células inmunes infiltrantes**

Se recolectó el medio de cultivo y se filtró con organza, evitando así el paso de fragmentos de piel. Las células suspendidas en el medio se concentraron por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. El botón se lavó con PBS, y posterior a otra fase de centrifugación, se resuspendió en un volumen conocido del disolvente para calcular el número de células vivas mediante el uso de un hemocitómetro.

De acuerdo con la cantidad de células vivas recuperadas para cada condición, éstas fueron distribuidas en placas de 96 pozos con un mínimo alrededor de 50000 células por pozo. Las células se activaron con la enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) (Toxin Technology, Inc) a una concentración final de 1µg/mL en 100 µL de medio RPMI-1640. Las células estimuladas (+SEB) y sus

controles correspondientes (-SEB) se incubaron durante 3 días a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurridos los 3 días de incubación, la placa fue centrifugada, se colectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C para el posterior análisis de citocinas extracelulares. Las células se recuperaron para las tinciones extracelulares e intracelulares con anticuerpos marcados.

### **7.3. Tinción extracelular**

Para diferenciar a los linfocitos T cooperadores (CD4<sup>+</sup>) de las demás poblaciones celulares se empleó la siguiente combinación de anticuerpos monoclonales: anti-CD3-Pacific Blue (Clona UCHT1, BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CD4-PE-Cy7 (Clona SK3, BioLegend) y anti-CD8-APC-H7 (Clona SK1, BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

La placa se centrifugo a 1500 rpm durante 4 minutos, se desechó el sobrenadante y se adicionó a cada pozo 100 µL de buffer de FACS (Anexo II). Se resuspendieron los botones celulares y la placa se incubó durante 20 minutos en hielo para permitir el bloqueo de los lugares de pegado inespecífico en la superficie celular. Después de otro ciclo de centrifugación, se retiró el sobrenadante, las células se resuspendieron en 35 µL de la mezcla de anticuerpos en FACS y se incubaron 20 minutos en hielo. Al concluir el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con 130 µL de FACS para eliminar del medio a los anticuerpos que no reaccionaron.

### **7.4. Fijación**

Las células fueron fijadas adicionando a cada pozo 50 µL de solución de fijación/permeabilización (eBioscience) y se resuspendieron e incubaron durante

una hora en hielo. La fijación es esencialmente un procedimiento para la preservación de la morfología y composición química de la célula.

### **7.5. Tinción intracelular de factores de transcripción**

En la tinción para los factores de transcripción se usó la siguiente mezcla de anticuerpos monoclonales en solución permeabilizante: anti-RUNX-1-PE (Clona RXDMC, eBioscience), anti-T-bet-PerCP-Cy5.5 (clona 4B10, BioLegend y anti-ROR $\gamma$ t-APC (clona AFKJS-9, eBioscience) para identificar a los linfocitos Th17 y diferenciar entre convencionales y patogénicos.

Las células se lavaron con 130  $\mu$ L de solución permeabilizante (eBioscience), se adicionaron 35  $\mu$ L de la mezcla de anticuerpos y se incubaron durante 1 hora en hielo.

Al concluir el tiempo de incubación, las células se lavaron con 130  $\mu$ L de permeabilizante, después con 130  $\mu$ L de FACS y finalmente se resuspendieron en 150  $\mu$ L de FACS para ser conservadas en refrigeración hasta su análisis por citometría de flujo.

Se elaboraron FMOs como controles para la corrección de la interferencia entre los fluorocromos. Su preparación consistió en someter a las células a todo el proceso de tinción, pero omitiendo la adición de los anticuerpos intracelulares.

### **7.6. Tinción extracelular de citocinas**

La determinación de citocinas en los sobrenadantes +/- SEB se llevó a cabo mediante arreglos de perlas citométricas, usando el Kit Flowcytomix Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13-plex (eBioscience) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Con dicho kit se pudieron analizar simultáneamente las

concentraciones de las citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, IL-22, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

### **7.7. Tinción intracelular de citocinas**

En el caso de las tinciones intracelulares de citocinas, 6 horas antes de concluido el tiempo de incubación con SEB, las células fueron tratadas con brefeldina A/monensina (eBioscience) para bloquear el transporte intracelular. Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de fijación y tinción intracelular, marcando con una mezcla de: anti-CD3-Pacific Blue (Clona UCHT1, BioLegend), anti-CD4-BrV 421 (clona RPA-T4, Biolegend), anti-T-bet-PerCP-Cy5.5 (clona 4B10, BioLegend), anti-ROR $\gamma$ t-APC (clona AFKJS-9, eBioscience), anti-IL-17A-PECy7 (Clona eBio64DEC17, eBioscience) y anti-IFN- $\gamma$ -PE (clona 4S.B3, BioLegend). También se elaboraron FMOs como controles de la tinción intracelular.

En el Diagrama 1 se resume la secuencia experimental descrita anteriormente. En el Diagrama 2 se describen las condiciones experimentales de estudio.

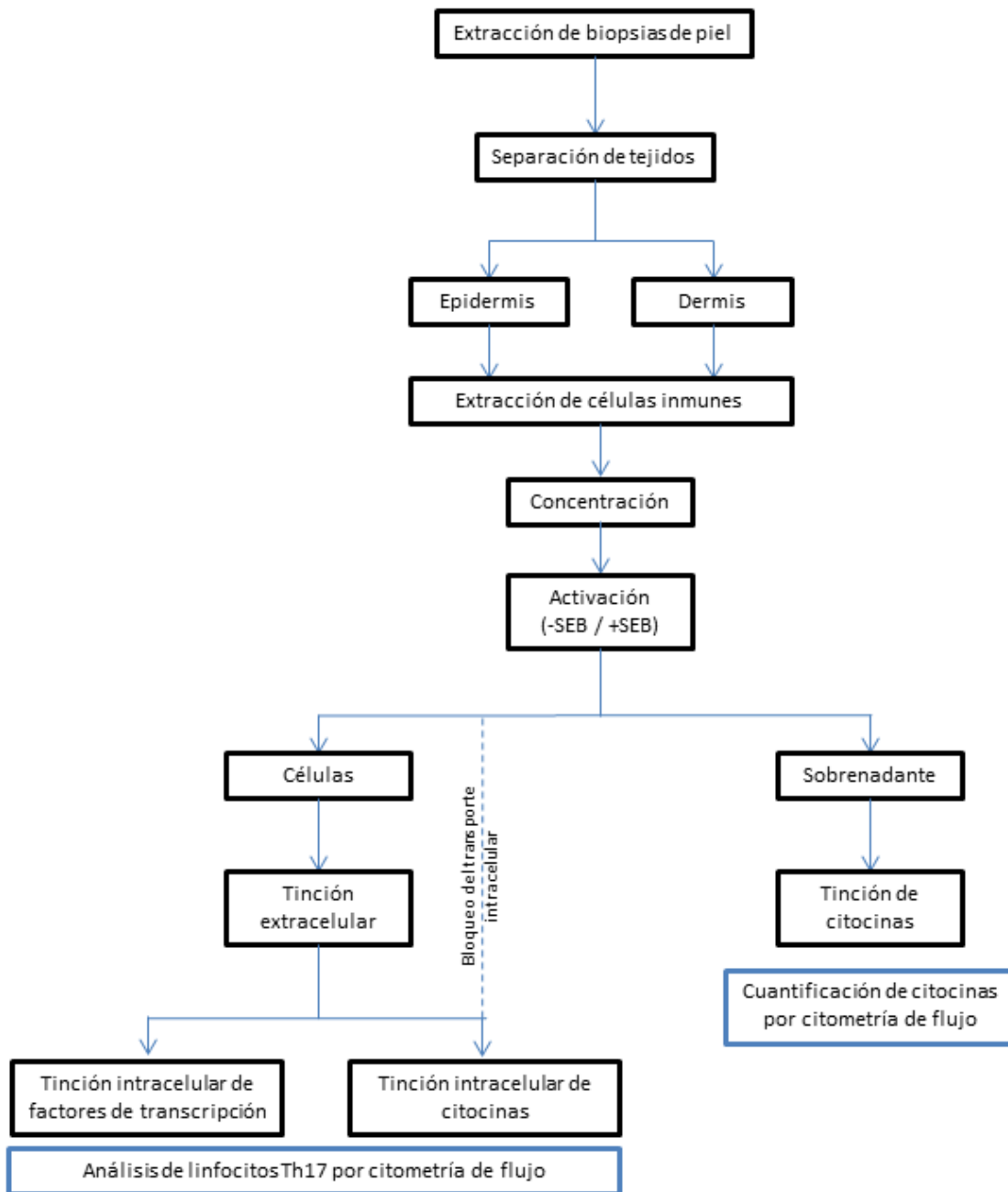


Diagrama 1. Metodología experimental para el análisis de las proporciones de linfocitos Th17 infiltrantes en piel y su expresión de citocinas. Cuantificación de citocinas extracelulares expresadas por el total de células infiltrantes.

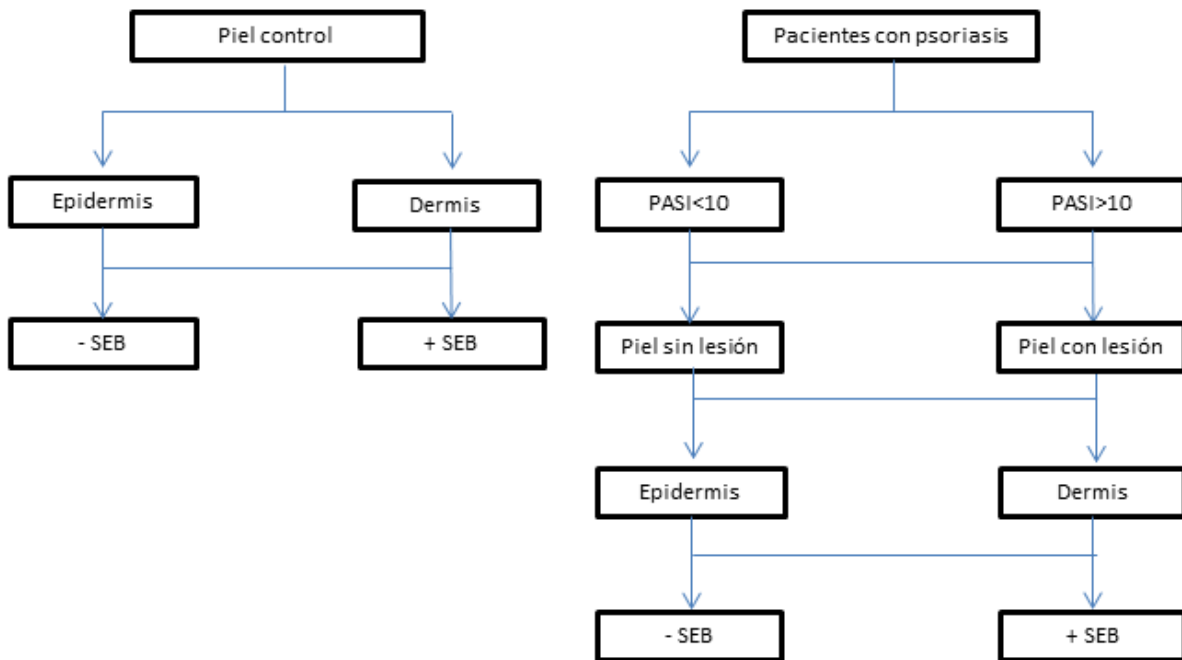


Diagrama 2. Condiciones experimentales de estudio. Un total de 4 condiciones para la piel control y 16 para la piel de los pacientes con psoriasis.

## 7.8. Análisis por citometría de flujo

Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo BD FACSCanto II y analizadas utilizando el programa FlowJo.

### 7.8.1. Linfocitos Th17

Para el análisis de las poblaciones de linfocitos Th17, se generó una gráfica FSC-H vs FSC-A y se seleccionaron las células individuales, las cuales correlacionan linealmente (Figura 4A). A partir de estos singuletes se trazó una gráfica SSC-A vs FSC-A, se obtuvo la región correspondiente a la población de linfocitos (Figura 4B) y se aisló la subpoblación T en una gráfica de SSC-A vs CD3 (Figura 4C).



Se identificaron a los linfocitos Th17 construyendo la gráfica de CD4 vs ROR $\gamma$ t, siendo éstos, positivos para ambos marcadores (Figura 4D). La diferenciación entre linfocitos Th17 convencionales y patogénicos se realizó mediante una gráfica Runx-1 vs T-bet, donde ambas poblaciones son positivas a RUNX-1, pero sólo los linfocitos Th17 patogénicos son positivos para T-bet (cuadrante superior derecho, Figura 4E).

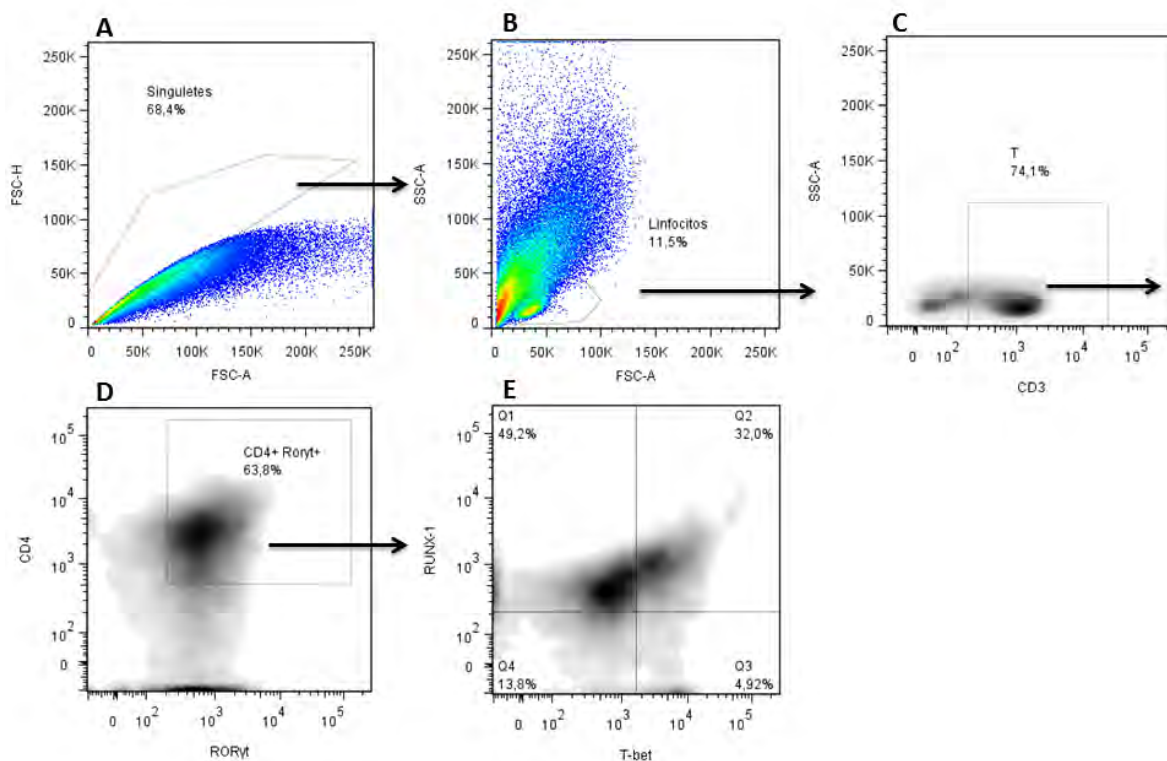


Figura 4. Metodología para el análisis de las proporciones de linfocitos Th17 convencionales y patogénicos infiltrantes en la dermis de pacientes con psoriasis.

### 7.8.2. Citocinas extracelulares

Estándares y muestras fueron leídas en el citómetro. Se obtuvieron las regiones R1 y R2, según el tamaño y la granularidad de las perlas (Figura 5A), y a partir de éstas, se identificaron las regiones de las citocinas concorde a la emisión de fluorescencia de la perla (eje Y) y la cantidad de citocina adherida (eje X) (Figura 5B y 5C).

Con la mediana de fluorescencia se construyeron las curvas de calibración para cada citocina (Figura 5D). La mediana de fluorescencia de las citocinas en las muestras de pacientes y controles se extrapolaron en las curvas de calibración para calcular su concentración en los sobrenadantes. Las concentraciones se ajustaron a un número constante de 50 000 células.

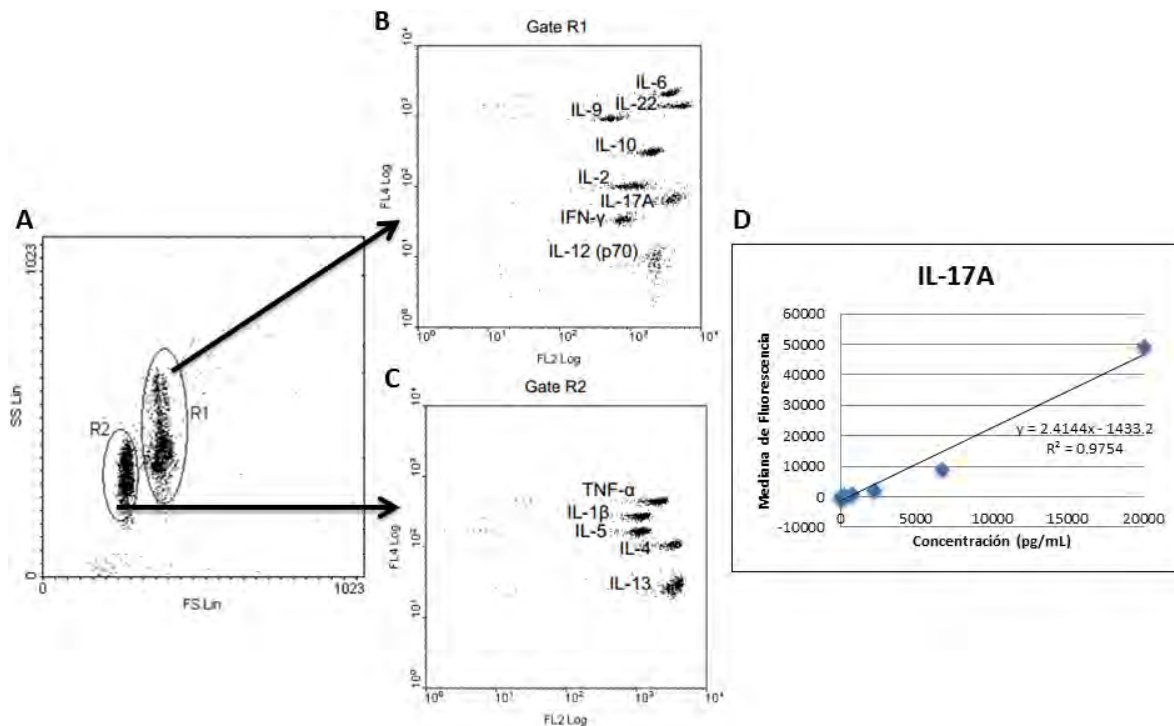


Figura 5. Análisis de citocinas extracelulares para el cálculo de las concentraciones en los sobrenadantes de las células infiltrantes en la dermis de pacientes con psoriasis.

### 7.8.3. Citocinas intracelulares

Para el análisis de citocinas intracelulares en la población Th17 patogénica, se aislaron secuencialmente las siguientes regiones: singuletes (Figura 6A), linfocitos (Figura 6B), linfocitos T totales (Figura 6C) y células Th17 (Figura 6D). Los linfocitos Th17 patogénicos resultan ser dobles positivos en una gráfica ROR $\gamma$ t vs T-bet (Figura 6E), y en ellos se analizaron las proporciones de células que expresan IL-17A e IFN- $\gamma$  (Figura 6F).

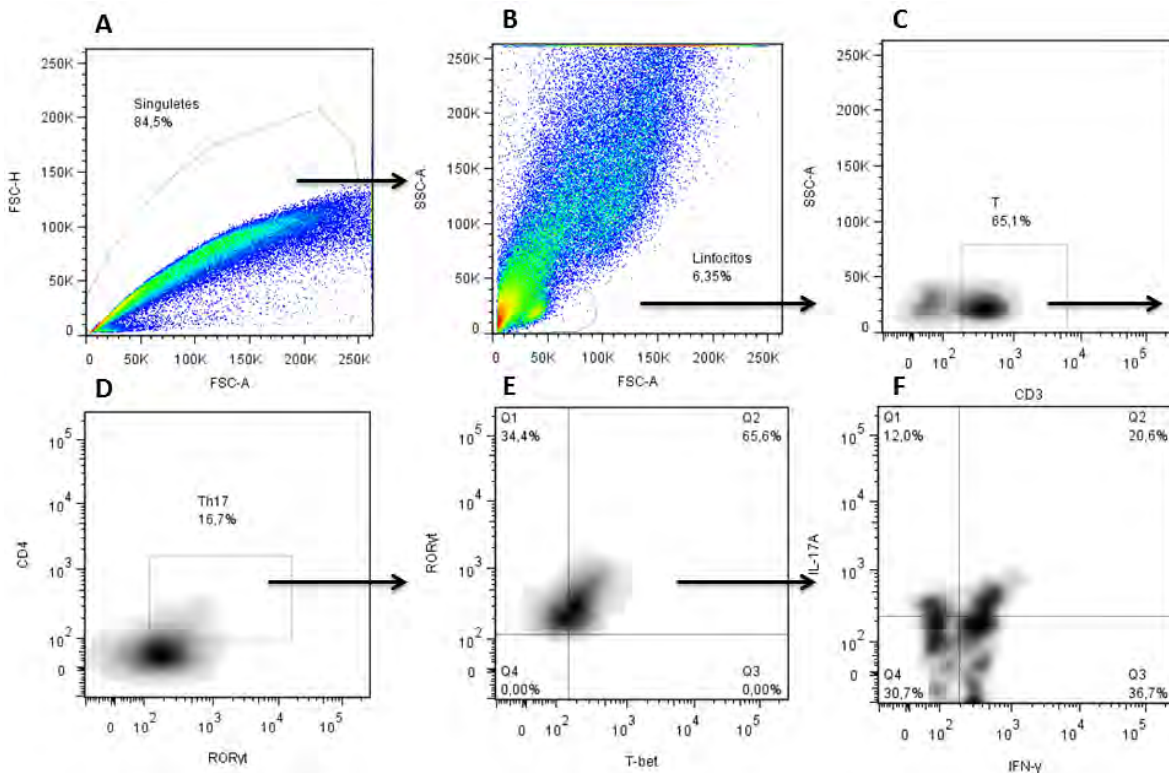


Figura 6. Metodología para el análisis de las proporciones de linfocitos Th17 patogénicos productores de IL-17A e IFN- $\gamma$ .

## 7.9. Análisis estadístico

Se calcularon las frecuencias de las poblaciones de interés y la concentración de citocinas en los sobrenadantes para evaluar estadísticamente las diferencias entre las distintas condiciones (con/sin lesión, +/- SEB), grupos de severidad (PASI) y entre pacientes y controles.

El programa estadístico empleado fue GraphPad Prism 5. Para elegir las pruebas estadísticas de análisis, se determinó la distribución de los datos con la prueba de normalidad ómnibus D'Agostino y Pearson. Para todas las pruebas se consideró  $P < 0.05$  como nivel de significancia estadística (Tabla 3).

Tabla 4. Valores de P y niveles de significancia.

<b>Nivel de significancia</b>	<b>Valor de P</b>
ns	$>0.05$
*	$\leq 0.05$
**	$\leq 0.01$
***	$\leq 0.001$

La prueba t pareada se empleó en el análisis de muestras con y sin tratamiento con SEB que mostraron una distribución gaussiana; la prueba de rangos con signos de Wilcoxon para las muestras que no mostraron tal distribución.

Para analizar las diferencias entre: la condición del tejido (lesionado y no lesionado), PASI (menor o mayor a 10) y entre pacientes y controles, se aplicó una prueba de t no pareada entre los datos que mostraron distribución gaussiana, con la corrección de Welch's cuando no se asume que las varianzas son significativamente diferentes. A los datos que no mostraron una distribución gaussiana se les aplicó la prueba de Mann Whitney.

En el análisis de correlación se usó la prueba de Pearson en los datos con distribución gaussiana y la prueba de Spearman para las poblaciones no paramétricas.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Linfocitos Th17 totales

En la tabla 5 se muestra el tamaño de las poblaciones de estudio.

Tabla 5. Tamaño de las poblaciones de pacientes y controles para el análisis de linfocitos Th17.

<b>CONTROLES</b>		<b>n</b>			
Dermis -SEB		10			
Dermis +SEB		10			
<b>PACIENTES</b>					
<b>PASI &lt;10</b>		<b>n</b>	<b>PASI &gt;10</b>		<b>n</b>
Dermis sin lesión -SEB		15	Dermis sin lesión -SEB		8
Dermis sin lesión +SEB		21	Dermis sin lesión +SEB		14
Dermis con lesión -SEB		21	Dermis con lesión -SEB		15
Dermis con lesión +SEB		21	Dermis con lesión +SEB		15

Ya se ha reportado que en la piel de pacientes con psoriasis existe una mayor infiltración de células Th17 en piel sin lesión, y a su vez, un aumento en la piel lesionada, en comparación con la piel de controles sanos. <sup>(26, 64)</sup>

En el presente trabajo se analizaron las frecuencias de células Th17 infiltrantes en la dermis. La infiltración de células Th17 en epidermis es escasa, por lo que no fue posible hacer comparaciones; la mayoría de los linfocitos CD4<sup>+</sup> permanecen selectivamente en la dermis, mientras que los CD8<sup>+</sup> migran a la epidermis debido a la expresión diferencial de quimiocinas e integrinas de las células y los tejidos. <sup>(27, 28)</sup>

Con respecto a la frecuencia de linfocitos Th17 en el total de células infiltrantes (Figura 7), se aprecia un aumento de la frecuencia Th17 para la aparición de la lesión en los pacientes con PASI bajo. En los pacientes con PASI alto no hay un incremento aparente de la frecuencia Th17 en piel lesionada, ocasionado tal vez por la infiltración de otras poblaciones celulares que tienen una mayor participación en el progreso a lesiones psoriásicas más severas.

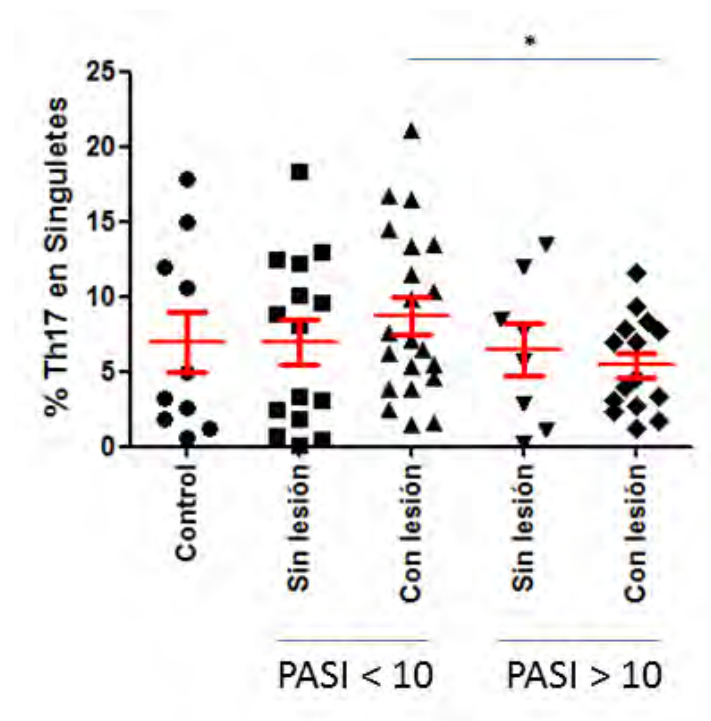


Figura 7. Frecuencia basal de linfocitos Th17 del total de células infiltrantes en la dermis de pacientes con psoriasis.

En las células Th17 infiltrantes del total de células T, la frecuencia basal en los individuos control es similar a la de la piel de apariencia normal en los pacientes con PASI bajo (Figura 8). El aumento de la frecuencia de células Th17 en la dermis de piel lesionada, con respecto a la no lesionada, en ambos grupos de pacientes, colocan a estas células como participes de la iniciación del proceso inflamatorio y de la aparición de las lesiones.

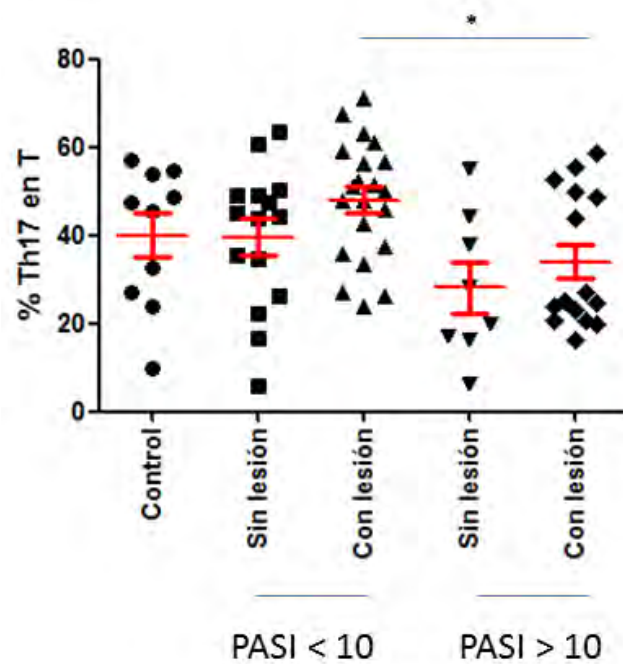


Figura 8. Frecuencia basal de linfocitos Th17 del total de células T infiltrantes en la dermis de pacientes con psoriasis.

En los pacientes con PASI alto se observa que las frecuencias de Th17 son menores a la proporción normal de los sujetos control. La disminución de la frecuencia en la dermis sin lesión podría sugerir la migración de las células Th17 al tejido lesionado, recordando que la muestra de piel no lesionada fue extraída de una zona cercana a las lesiones. En la dermis lesionada la frecuencia de Th17 incrementa con respecto a la no lesión, sin embargo, aún menor a la normal, posiblemente debido al aumento de otras poblaciones de células T, como Th1 y T reguladoras, al ser lesiones de mayor severidad.



La activación con SEB aumentó la proporción de Th17 en células T sólo en los pacientes con PASI alto (Figura 9).

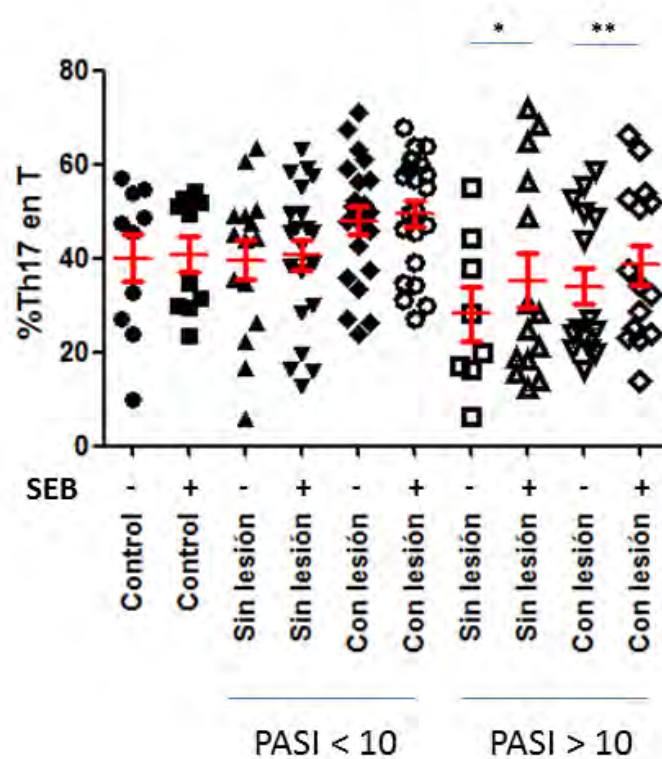


Figura 9. Efecto de la activación con SEB en la frecuencia de linfocitos Th17 del total de células T infiltrantes en la dermis de pacientes con psoriasis.

Tomando en cuenta que en este grupo de pacientes se está llevando a cabo un exacerbado proceso inflamatorio, el aumento en la frecuencia de Th17 puede deberse a un cambio en el fenotipo de otras poblaciones de células T. Se ha demostrado que las células Treg no son células terminalmente diferenciadas y que pueden rediferenciarse *in vivo* a una variedad de células T efectoras, incluyendo a las células Th17, después de perder la expresión de FOXP3 bajo ciertas condiciones inflamatorias. <sup>(65)</sup>

En cuanto a la frecuencia de Th17 en el total de células infiltrantes, la activación con SEB produce también el incremento de otras poblaciones celulares, que se refleja en una disminución de la frecuencia de Th17 (Figura 10).

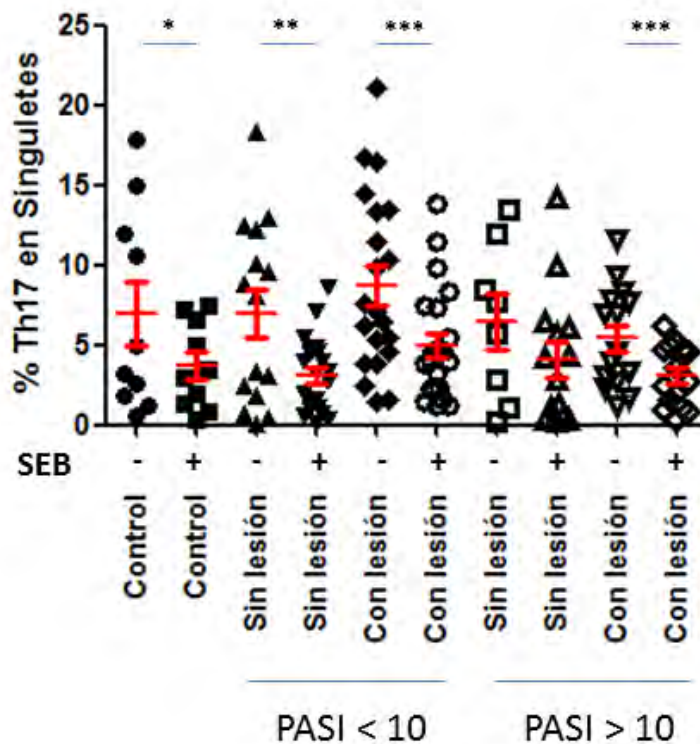


Figura 10. Efecto de la activación con SEB en la frecuencia de linfocitos Th17 del total de células infiltrantes en la dermis de pacientes con psoriasis.

Lo que podemos destacar hasta el momento es que la proporción de células Th17 se ve aumentada en las lesiones psoriásicas y que en pacientes con PASI alto parecen ser otras poblaciones celulares las que incrementan en número. La activación con SEB provoca un cambio fenotípico a Th17 y el aumento de otras poblaciones celulares.

## 8.2. Linfocitos Th17 patogénicos

De acuerdo con los factores de transcripción expresados por las células Th17, diferenciamos a los linfocitos Th17 patogénicos ( $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ ,  $\text{RUNX-1}^+$ ,  $\text{T-bet}^+$ ) de los Th17 convencionales ( $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ ,  $\text{RUNX-1}^+$ ,  $\text{T-bet}^-$ ).

La frecuencia de linfocitos Th17 patogénicos del total de células Th17 incrementa en la dermis de la piel lesionada de los pacientes con PASI bajo, en comparación con la piel no lesionada y el control, y ésta a su vez es mayor en la piel de los pacientes con PASI alto (Figura 11) sugiriendo la participación de células Th17 patogénicas en la aparición de la lesión y el desarrollo de lesiones psoriásicas de mayor severidad.

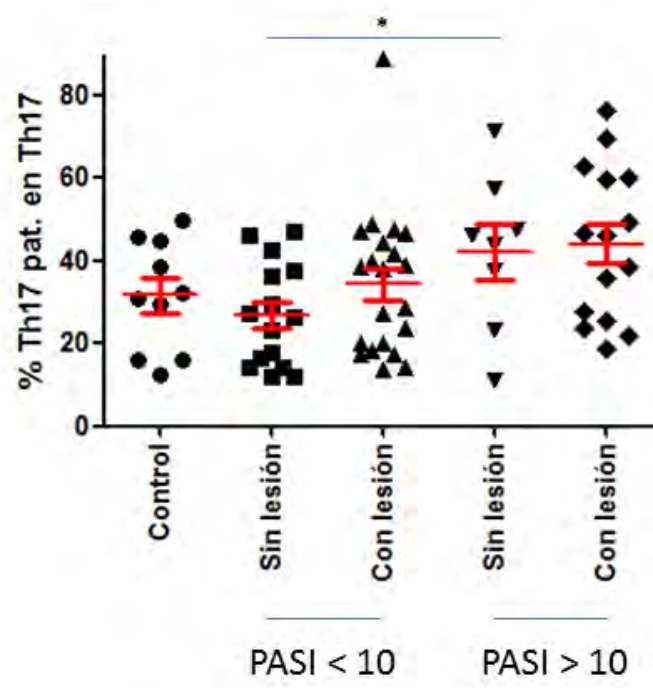


Figura 11. Frecuencia basal de linfocitos Th17 patogénicos del total de células Th17 infiltrantes en la dermis de pacientes con psoriasis.

La activación con SEB tuvo un efecto aditivo en la frecuencia de los Th17 patogénicos (Figura 12), esto debido probablemente al cambio fenotípico de otras

poblaciones de linfocitos T hacia Th17 patogénicas, o incluso por la transformación de los linfocitos Th17 convencionales al fenotipo patogénico, favorecidos por las condiciones inflamatorias del medio extracelular.

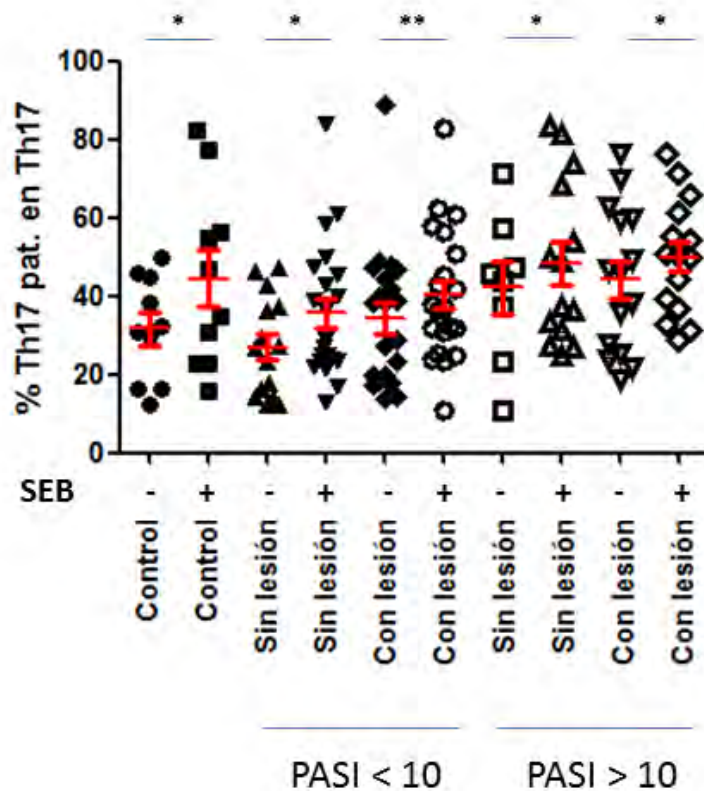


Figura 12. Efecto de la activación con SEB en la frecuencia de linfocitos Th17 patogénicos del total de Th17 infiltrantes en la dermis de pacientes con psoriasis.

Para determinar si existe realmente una relación entre la frecuencia de linfocitos Th17 patogénicos y la severidad de la psoriasis, se realizó un análisis de correlación (Figura 13).

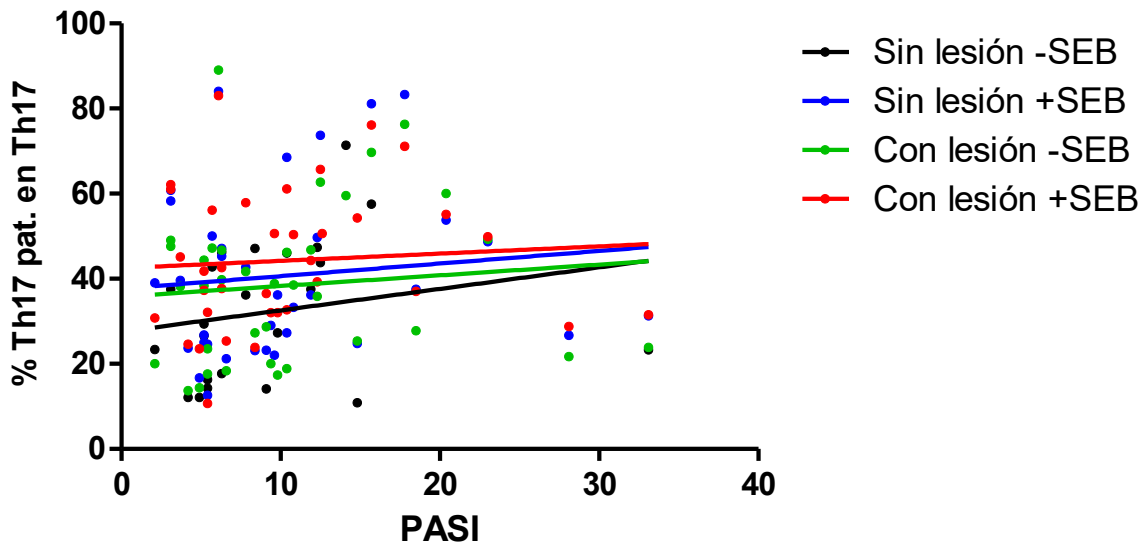


Figura 13. Análisis de correlación entre la frecuencia de linfocitos Th17 patogénicos y la severidad de la psoriasis.

Se analizó a todos los pacientes con sus respectivos PASI y obtuvimos que para todas las condiciones no existe una correlación estadísticamente significativa. A pesar de estos resultados podemos observar una tendencia positiva en cuanto a que:

- Los pacientes con PASI alto generalmente tienen las mayores frecuencias de linfocitos Th17 patogénicos en piel.
- Las frecuencias en la piel lesionada son mayores que en la no lesionada, además la activación con SEB incrementa tales frecuencias.

Resumiendo, los linfocitos Th17 patogénicos se encuentran presentes en la piel, tanto en pacientes como en controles sanos, con un aparente aumento en las lesiones y con una mayor frecuencia en los pacientes de PASI alto, pero sin correlacionar con el grado de severidad; adicionalmente la activación con SEB incrementa tales frecuencias.

### 8.3. Linfocitos Th17 convencionales

Analizando las frecuencias de Th17 convencionales en linfocitos T no observamos cambios significativos (Figura 14).

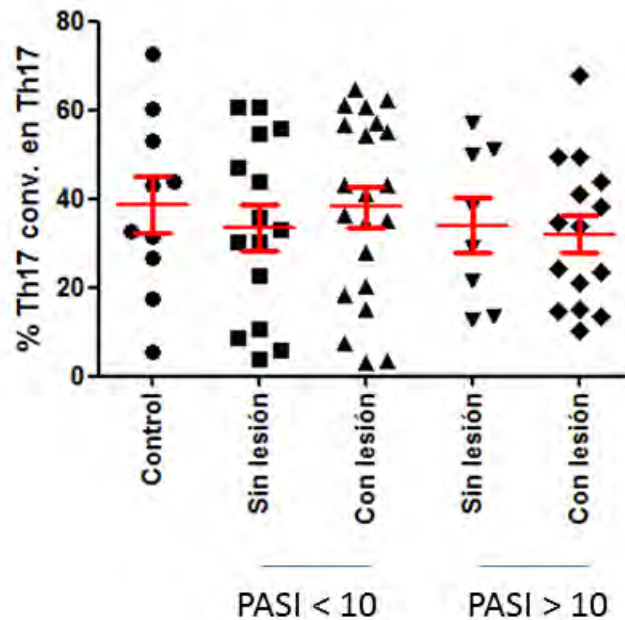


Figura 14. Frecuencia basal de linfocitos Th17 convencionales del total de células Th17 infiltrantes en la dermis de pacientes con psoriasis.

La activación con SEB disminuyó la frecuencia de linfocitos Th17 convencionales (Figura 15), sugiriendo que la activación y el ambiente inflamatorio podrían favorecer su conversión al fenotipo Th17 patológico.

Con el análisis estadístico observamos que tampoco existe una correlación entre el porcentaje de Th17 convencionales y la severidad de la psoriasis para todas las condiciones (Figura 16).

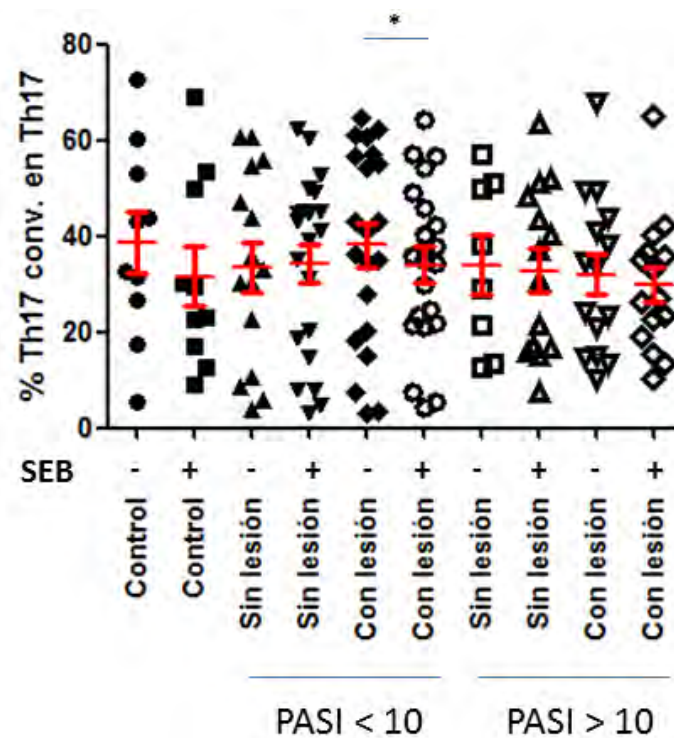


Figura 15. Efecto de la activación con SEB en la frecuencia de linfocitos Th17 convencionales del total de Th17 infiltrantes en la dermis de pacientes con psoriasis.

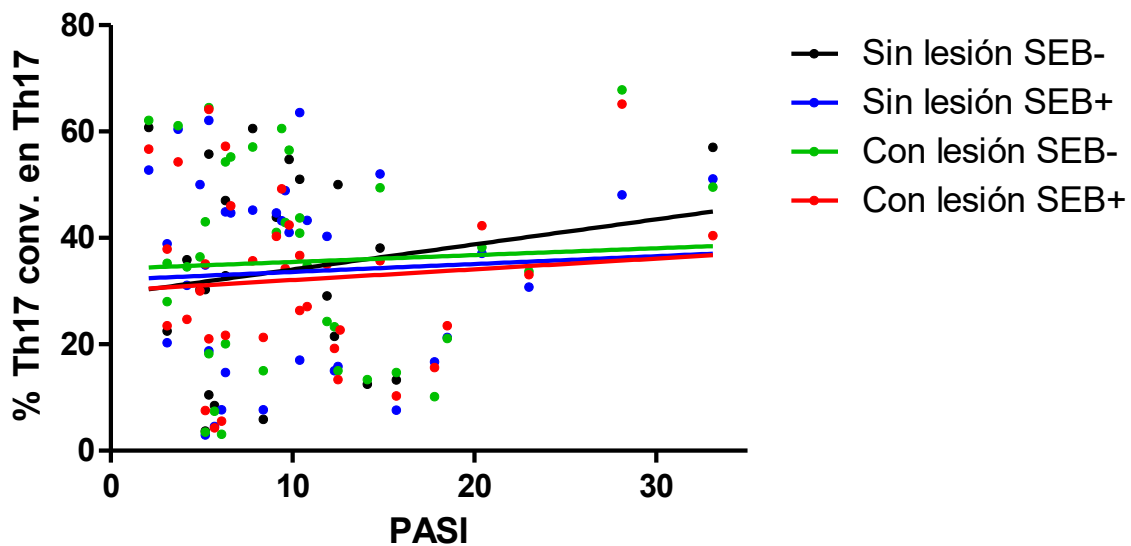


Figura 16. Análisis de correlación entre la frecuencia de linfocitos Th17 convencionales y la severidad de la psoriasis.

#### 8.4. Citocinas extracelulares

El proceso inflamatorio y las citocinas del medio extracelular provocan que las células infiltrantes en la piel de los pacientes con psoriasis se activen y expresen su perfil de citocinas. Los resultados para las citocinas extracelulares que se presentan a continuación corresponden a la concentración de citocinas expresadas por 50,000 células del total de infiltrantes y activadas con SEB.

El tamaño de las poblaciones de estudio son las siguientes:

Tabla 6. Tamaño de las poblaciones de pacientes y controles para el análisis de citocinas en los sobrenadantes de las células infiltrantes activadas con SEB.

<b>CONTROLES</b>		<b>n</b>	
Dermis +SEB		6	
<b>PACIENTES</b>			
<b>PASI &lt;10</b>		<b>PASI &gt;10</b>	
<b>n</b>		<b>n</b>	
Dermis sin lesión +SEB	17	Dermis sin lesión +SEB	12
Dermis con lesión +SEB	17	Dermis con lesión +SEB	12

El tamaño de la población del grupo control es insuficiente, por lo que su análisis estadístico es poco confiable.

##### 8.4.1. IL-17A e IL-22

En los pacientes con PASI bajo la expresión de IL-17A por las células activadas está fuertemente incrementada en la dermis lesionada, al compararlo con la dermis sin lesión. Es interesante que este incremento no se observa en los pacientes con PASI mayor a 10 (Figura 17A).



En cuanto a IL-22, los niveles de expresión son menores, en comparación con los de IL-17, sin embargo también se observa una mayor expresión de IL-22 por las células activadas de la dermis lesionada de los pacientes con PASI bajo y la disminución en pacientes con PASI alto (Figura 17B).

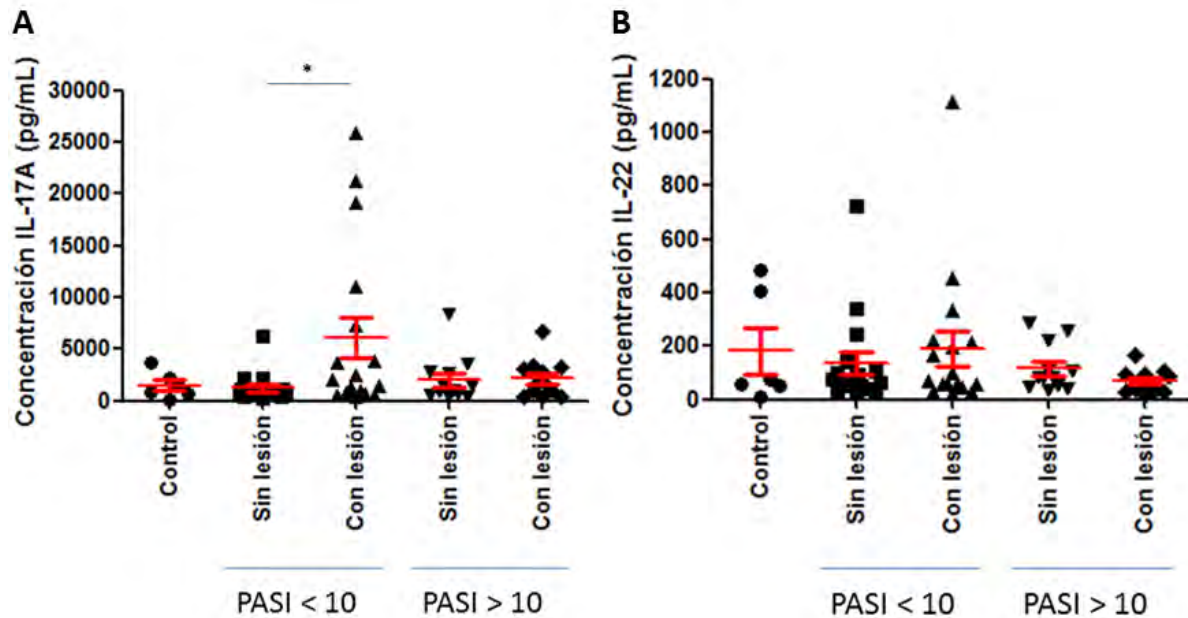


Figura 17. Concentración de IL-17A (A) e IL-22 (B) en los sobrenadantes de células infiltrantes en dermis de pacientes con psoriasis, activadas con SEB.

La baja concentración de IL-17A e IL-22 en la piel de los pacientes con PASI alto puede ser debida, en conjunto, a las siguientes condiciones:

- 1) Disminución en la frecuencia de linfocitos Th17 en pacientes con PASI alto.
- 2) Incremento de la frecuencia de Th17 patogénicos. Recientemente se ha demostrado que T-bet interactúa con el factor de transcripción RUNX-1 y esta interacción bloquea la transactivación de *Rorc* mediada por RUNX-1.<sup>(66)</sup> La inhibición de RUNX-1 y la consecuente disminución de ROR- $\gamma$ t provocan una menor expresión de las citocinas IL-17A e IL-22.

### 3) Disminución de las proporciones de Th17 convencionales.

Tales resultados posicionan a estas citocinas Th17 como posibles participes en el inicio del proceso inflamatorio y en la aparición de las lesiones, y quizá sean otras citocinas las que tomen un papel de mayor importancia en el progreso a lesiones de mayor severidad.

#### **8.4.2. IFN- $\gamma$**

En ambos grupos de pacientes la concentración de IFN- $\gamma$  en la dermis sin lesión es similar a la concentración normal de individuos sanos; en las lesiones estas concentraciones incrementan (Figura 18).

El IFN- $\gamma$  puede provenir de linfocitos Th1, pero también de linfocitos Th17 patogénicos, los cuales se encuentran incrementados en la piel lesionada. Concentraciones similares de IFN- $\gamma$  en ambos grupos de pacientes sugieren que esta citocina no es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de lesiones psoriásicas más severas.

#### **8.4.3. TNF- $\alpha$**

La concentración de TNF- $\alpha$  se mantiene constante en todas las condiciones por lo que parece no intervenir directamente en la aparición de lesiones ni en la severidad de las mismas (Figura 19).

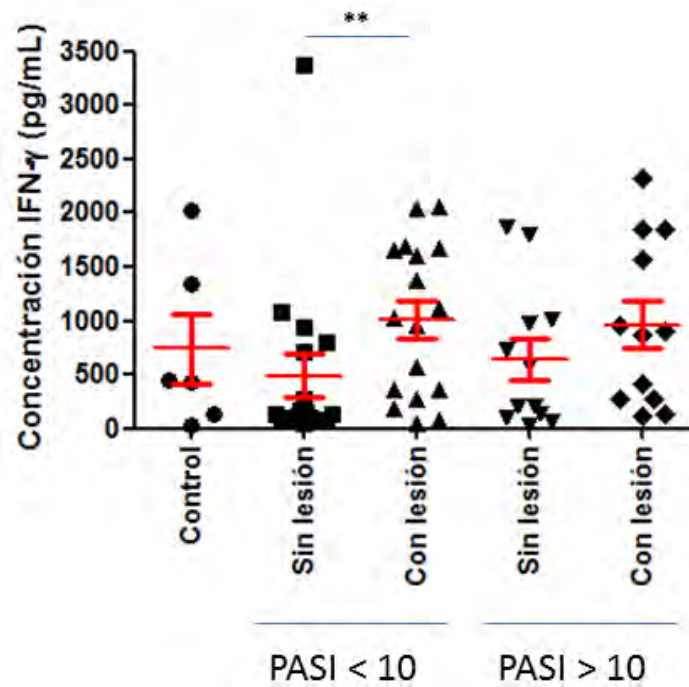


Figura 18. Concentración de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de células infiltrantes en dermis de pacientes con psoriasis, activadas con SEB.

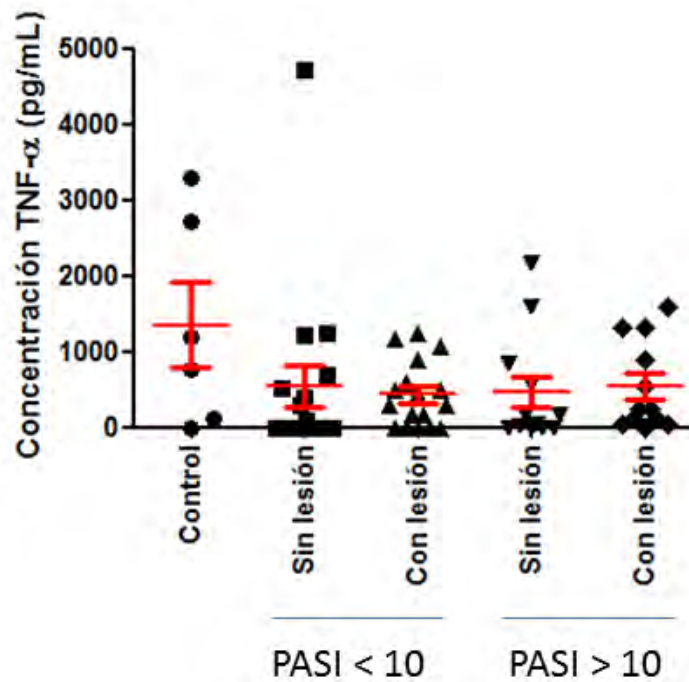


Figura 19. Concentración de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de células infiltrantes en dermis de pacientes con psoriasis, activadas con SEB.

#### 8.4.4. IL-10

Los niveles de IL-10 se encuentran aumentados por igual en la dermis lesionada de ambos grupos de PASI (Figura 20). Claro está que sus acciones no son suficientes para reprimir el proceso inflamatorio y que el efecto supresor de las células productoras es deficiente. Sería interesante en este punto el análisis de las frecuencias y la función de las células T reguladoras infiltrantes en la piel de pacientes con psoriasis como participantes en el desarrollo y en la gravedad de la psoriasis.

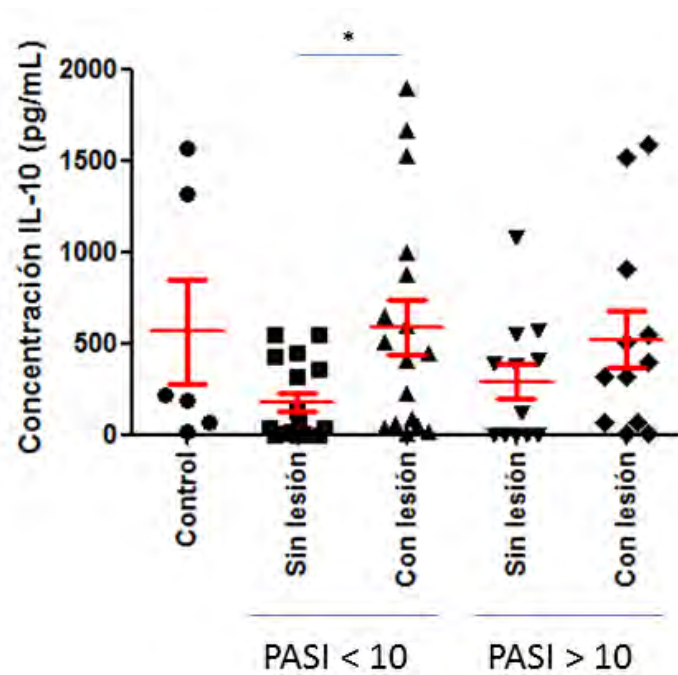


Figura 20. Concentración de IL-10 en los sobrenadantes de células infiltrantes en dermis de pacientes con psoriasis, activadas con SEB.

#### 8.4.5. IL-9

Con lo que respecta a IL-9 observamos una aparente disminución de su concentración en relación al grado de lesión en la piel.

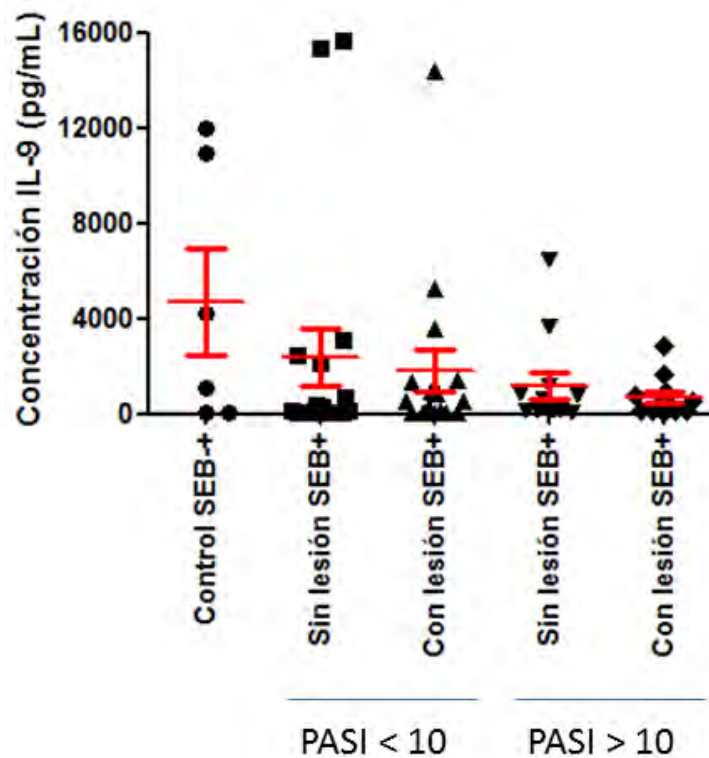


Figura 21. Concentración de IL-9 en los sobrenadantes de células infiltrantes en dermis de pacientes con psoriasis, activadas con SEB.

Las células Th17 humanas y de ratón son una fuente significativa de IL-9. En modelos animales de gastritis autoinmune, células Th17 de ratones deficientes de IL-9 han mostrado inducir una patología más severa que en los ratones WT, asociada con la reducción de la actividad de mastocitos en la mucosa. <sup>(67)</sup>

IL-9 es un factor de crecimiento y activación de mastocitos, que además parece ser importante para su reclutamiento y activación en el tejido. Estudios indican que la interacción entre IL-9 y mastocitos es crucial para la tolerancia a aloinjertos;

ratones deficientes de mastocitos son incapaces de inducir tolerancia y la neutralización de IL-9 en ratones tolerantes acelera enormemente el rechazo. <sup>(68)</sup>

En células Treg, IL-9 mejora las funciones supresoras in vitro, y su ausencia provoca un cuadro más severo de EAE en ratón. <sup>(69)</sup>

Apoyándonos de la función inmunoreguladora de IL-9, la disminución de sus niveles en las lesiones psoriásicas y en los pacientes con un padecimiento más severo, explicaría en parte la deficiencia en la regulación del proceso inflamatorio.

En este punto, interesante es conocer que subpoblaciones de células T son las responsables de la disminución de los niveles de IL-9 en piel psoriásica. La disminución en la expresión de IL-9 por linfocitos Th17 patogénicos, en comparación con linfocitos Th17 convencionales, reafirmaría que éstas son células menos reguladas. La disminución en la expresión de IL-9 por las células Treg conduciría también a una actividad supresora deficiente.

### **8.5. Citocinas intracelulares**

Para demostrar la funcionalidad de T-bet en los linfocitos Th17 patogénicos activados y su contribución en los niveles de IL-17 e IFN- $\gamma$ , se realizó la tinción de citocinas intracelulares, previo bloqueo del transporte vesicular, a un paciente de cada grupo de severidad.

Coincidiendo con los resultados previamente discutidos, existe una mayor frecuencia de linfocitos Th17 patogénicos en la dermis lesionada, con mayores proporciones en el paciente de PASI severo. (Figura 22).

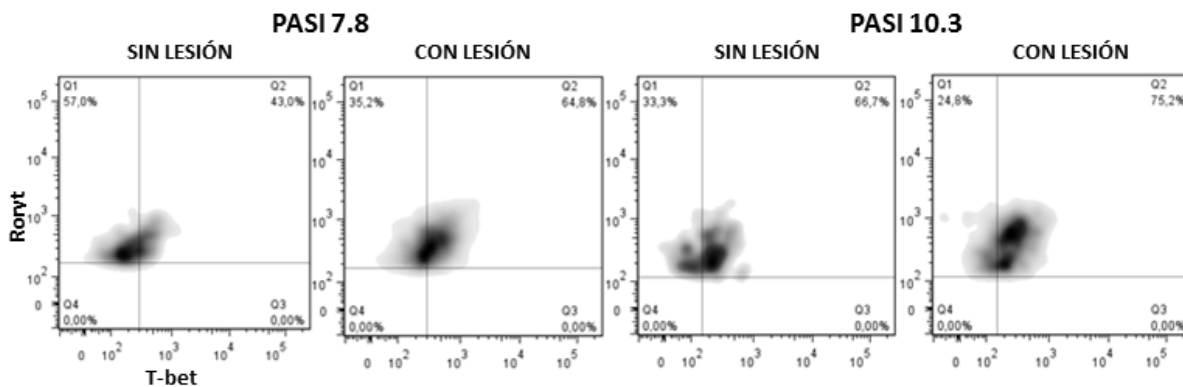


Figura 22. Frecuencia de linfocitos Th17 patogénicos infiltrantes en dermis de pacientes con psoriasis y activados con SEB.

Los resultados de la tinción de IL-17A e IFN- $\gamma$  intracelulares se muestran en la figura 23. En la dermis sin lesión del paciente con PASI bajo, los linfocitos Th17 patogénicos expresan IL-17. En la dermis lesionada ya existe una pequeña proporción de células que expresan IFN- $\gamma$  e IL-17A/IFN- $\gamma$ . Con respecto a la dermis del paciente con PASI alto, los porcentajes de células que expresan IFN- $\gamma$  e IL-17A/IFN- $\gamma$  incrementan, teniendo los máximos en la dermis lesionada. La expresión de IFN- $\gamma$  por los linfocitos Th17 patogénicos coincide con el aumento en la concentración de la citocina en el análisis de los sobrenadantes, con lo que confirmamos que estas células están contribuyendo en los niveles de IFN- $\gamma$ .

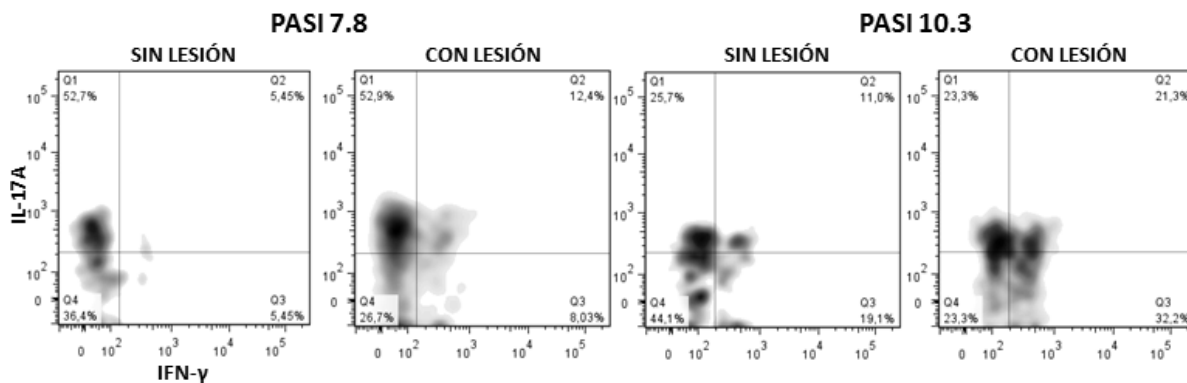


Figura 23. Frecuencia de linfocitos Th17 patogénicos activados que expresan IL-17A e IFN- $\gamma$ .

Los resultados obtenidos muestran claramente la presencia de linfocitos Th17 patogénicos, tanto en las lesiones como en la piel no lesionada de pacientes con psoriasis, y que la proporción de esta población puede ser influenciada por estímulos exógenos como el SEB. Estas alteraciones pudieran jugar un papel importante en el desarrollo de las lesiones, sin embargo la sola presencia de estas poblaciones no explica en su totalidad las diferencias en la severidad de la patología, ya que no se encontraron diferencias significativas entre pacientes con psoriasis leve y severa, y en muchos casos entre pacientes y controles. Por esta razón es posible que otras células también estén involucradas en la patología y contribuyan de manera determinante en la severidad de ésta.

## **9. CONCLUSIONES**

La proporción de linfocitos Th17 patogénicos se ve incrementada en la piel psoriásica y en los pacientes con PASI alto.

No existe una correlación estadísticamente significativa entre el PASI y el incremento en las proporciones de linfocitos Th17 patogénicos.

La activación con SEB incrementa la proporción de células Th17 patogénicas.

IL-17A, IL-22, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 no están relacionadas con el aumento de la severidad en las lesiones psoriásicas.

La producción de IL-9 se encuentra abatida en pacientes con psoriasis severa, lo que pudiera estar relacionado con la gravedad del cuadro.

En las células Th17 patogénicas estimuladas el factor de transcripción T-bet es funcional.



## 10.REFERENCIAS

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001 Jun;357(9270):1777-1789.
2. Chaplin DD, MD, PhD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-S23.
3. Gupta S, Louis AG. Tolerance and Autoimmunity in Primary Immunodeficiency Disease: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013 Oct;45(2):162-169.
4. Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:385-422.
5. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. 2007 Feb;445(7130):866-873.
6. Griffiths CE, Christophers E, Barker JN, et al. A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *Br J Dermatol*. 2007 Feb;156(2):258-262.
7. Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *J Invest Dermatol*. 2013 Feb;133(2):377-385.
8. Sabat R, Philipp S, Höflich C, et al. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol*. 2007 Oct;16(10):779-798.
9. Asociación Mexicana Contra la Psoriasis (AMCPSO). La psoriasis. <http://www.asociacionpsoriasis.com.mx>. Consultada el 10 de Octubre del 2015.
10. Puzenat E, Bronsard V, Prey S, et al. What are the best outcome measures for assessing plaque psoriasis severity? A systematic review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Apr;24(Suppl 2):10-16.
11. Nast A, Boehncke WH, Mrowietz U, et al. S3 - Guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris (English version). Update. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2012 Mar;10(Suppl 2):S1-S95.

12. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol.* 1985 Sep;13(3):450-456.
13. Baker BS, Bokth S, Powles A, et al. Group A streptococcal antigen-specific T lymphocytes in guttate psoriatic lesions. *Br J Dermatol.* 1993 May;128(5):493-499.
14. Brown DW, Baker BS, Ovigne JM, Hardman C, Powles AV, Fry L. Skin CD4+ T cells produce interferon-gamma in vitro in response to streptococcal antigens in chronic plaque psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2000 Mar;114(3):576-580.
15. McFadden J, Valdimarsson H, Fry L. Cross-reactivity between streptococcal M surface antigen and human skin. *Br J Dermatol.* 1991 Nov;125(5):443-447.
16. Gudmundsdottir AS, Sigmundsdottir H, Sigurgeirsson B, Good MF, Valdimarsson H, Jonsdottir I. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? *Clin Exp Immunol.* 1999 Sep;117(3):580-586.
17. Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Love TJ, Valdimarsson H. Peripheral blood T cell responses to keratin peptides that share sequences with streptococcal M proteins are largely restricted to skin-homing CD8(+) T cells. *Clin Exp Immunol.* 2004 Oct;138(1):83-93.
18. Leigh IM, Navsaria H, Purkis PE, McKay IA, Bowden PE, Riddle PN. Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. *Br J Dermatol.* 1995 Oct;133(4):501-511.
19. Bockelmann R, Horn T, Gollnick H, Bonnekoh B. Interferon-gamma-dependent in vitro model for the putative keratin 17 autoimmune loop in psoriasis: exploration of pharmaco- and gene-therapeutic effects. *Skin Pharmacol Physiol.* 2005 Jan-Feb;18(1):42-54.

20. Bonnekoh B, Huerkamp C, Wevers A, et al. Up-regulation of keratin 17 expression in human HaCaT keratinocytes by interferon-gamma. *J Invest Dermatol.* 1995 Jan;104(1):58-61.
21. Balci DD, Duran N, Ozer B, et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* cultivation and superantigen production in patients with psoriasis. *Eur J Dermatol.* 2009 May-Jun;19(3):238-242.
22. Kolls JK, Khader SA. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Dec;21(6):443-448.
23. Chen Z, Lin F, Gao Y, et al. FOXP3 and ROR $\gamma$ t: transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol.* 2011 May;11(5):536-542.
24. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology.* 2010 Feb;129(2):147-153.
25. Sundrud MS, Nolan MA. Synergistic and combinatorial control of T cell activation and differentiation by transcription factors. *Curr Opin Immunol.* 2010 Jun;22(3):286-292.
26. Lowes MA, Chamian F, Abello MV, et al. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 27;102(52):19057-19062.
27. Bos JD, Hagenaars C, Das PK, Krieg SR, Voorn WJ, Kapsenberg ML. Predominance of "memory" T cells (CD4+, CDw29+) over "naive" T cells (CD4+, CD45R+) in both normal and diseased human skin. *Arch Dermatol Res.* 1989;281(1):24-30.
28. Bovenschen HJ, Seyger MM, Van de Kerkhof PC. Plaque psoriasis vs. atopic dermatitis and lichen planus: a comparison for lesional T-cell subsets, epidermal proliferation and differentiation. *Br J Dermatol.* 2005 Jul;153(1):72-78.
29. Chan JR, Blumenschein W, Murphy E, et al. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med.* 2006 Nov 27;203(12):2577-2587.

30. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol.* 2008 May;128(5):1207-1211.
31. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet.* 2007 Feb;80(2):273-290.
32. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med.* 2004 Jan 5;199(1):125-130.
33. Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ. Gamma interferon induces different keratinocyte cellular patterns of expression of HLA-DR and DQ and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) antigens. *Br J Dermatol.* 1989 Jan;120(1):1-8.
34. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol.* 2005 Jan 1;174(1):164-173.
35. Jackson M, Howie SE, Weller R, Sabin E, Hunter JA, McKenzie RC. Psoriatic keratinocytes show reduced IRF-1 and STAT-1alpha activation in response to gamma-IFN. *FASEB J.* 1999 Mar;13(3):495-502.
36. Stratis A, Pasparakis M, Rupec RA, et al. Pathogenic role for skin macrophages in a mouse model of keratinocyte-induced psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest.* 2006 Aug;116(8):2094-2104.
37. Wang H, Peters T, Kess D, et al. Activated macrophages are essential in a murine model for T cell-mediated chronic psoriasiform skin inflammation. *J Clin Invest.* 2006 Aug;116(8):2105-2114.
38. Valyi-Nagy I, Jensen PJ, Albelda SM, Rodeck U. Cytokine-induced expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in neonatal skin explants. *J Invest Dermatol.* 1992 Sep;99(3):350-356.

39. Elder JT, Fisher GJ, Lindquist PB, et al. Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. *Science*. 1989 Feb 10;243(4892):811-814.
40. Higashiyama M, Matsumoto K, Hashimoto K, Yoshikawa K. Increased production of transforming growth factor-alpha in psoriatic epidermis. *J Dermatol*. 1991 Feb;18(2):117-119.
41. Walker JA, McKenzie AN. Development and function of group 2 innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol*. 2013 Apr;25(2):148-155.
42. Blumberg H, Conklin D, Xu WF, et al. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*. 2001 Jan 12;104(1):9-19.
43. Köks S, Kingo K, Vabrit K, et al. Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis. *Genes Immun*. 2005 Aug;6(5):407-415.
44. Sano S, Chan KS, Carbajal S, et al. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med*. 2005 Jan;11(1):43-49.
45. Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 1994 Mar;55(3):410-422.
46. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):845-858.
47. Peters A, Lee Y, Kuchroo VK. The many faces of Th17 cells. *Curr Opin Immunol*. 2011 Dec;23(6):702-706.
48. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-238.
49. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179-189.
50. Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:160-171.

51. Koenders MI, van den Berg WB. Translational mini-review series on Th17 cells: are T helper 17 cells really pathogenic in autoimmunity? *Clin Exp Immunol.* 2010 Feb;159(2):131-136.
52. Wolk K, Witte E, Wallace E, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2006 May;36(5):1309-1323.
53. Nowak EC, Noelle RJ. Interleukin-9 as a T helper type 17 cytokine. *Immunology.* 2010 Oct;131(2):169-173.
54. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Hirahara K, O'Shea JJ. T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. *Trends Immunol.* 2011 Sep;32(9):395-401.
55. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2008 Nov;128(11):2625-2630.
56. McGeachy MJ, Cua DJ. The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies. *Semin Immunol.* 2007 Dec;19(6):372-376.
57. Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med.* 2002 May 6;195(9):1129-1143.
58. Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2004 Jul 5;200(1):79-87.
59. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology.* 2010 Feb;129(2):147-153.
60. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2011 Mar;12(3):255-263.
61. Huber S, Gagliani N, Esplugues E, et al. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3<sup>-</sup> and Foxp3<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells

- in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity*. 2011 Apr 22;34(4):554-565.
62. El-Behi M, Ciric B, Dai H, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):568-575.
63. Codarri L, Gyölvéshi G, Tosevski V, et al. ROR $\gamma$ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):560-567.
64. Bjerke JR, Krogh HK, Matre R. Characterization of mononuclear cell infiltrates in psoriatic lesions. *J Invest Dermatol*. 1978 Nov;71(5):340-343.
65. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4<sup>+</sup> T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009 May;30(5):646-655.
66. Lazarevic V, Chen X, Shim JH, et al. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR $\gamma$ t. *Nat Immunol*. 2011 Jan;12(1):96-104.
67. Stephens GL, Swerdlow B, Benjamin E, et al. IL-9 is a Th17-derived cytokine that limits pathogenic activity in organ-specific autoimmune disease. *Eur J Immunol*. 2011 Apr;41(4):952-962.
68. Lu LF, Lind EF, Gondek DC, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*. 2006 Aug;442:997-1002.
69. Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3<sup>+</sup> natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 4;106(31):12885-12890.

## 11. ANEXOS

### I. Carta de consentimiento informado



#### *Caracterización de poblaciones celulares en lesiones y sangre periférica de pacientes con Psoriasis*



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

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

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

Su participación en este estudio es completamente voluntaria.

Por favor, lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:

Le pediremos que asista a una visita, en su visita se le realizará toma de biopsia de piel lesionada con psoriasis, piel no lesionada y una toma de muestra de sangre periférica.



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

Para poder realizarle la toma de muestra de sangre:

1. **NO deberá presentarse en ayuno** de ningún tipo.
2. Tomaremos una muestra de sangre venosa de uno de sus brazos.
3. Nos tardaremos aproximadamente 10 minutos en tomarle la muestra de sangre.

Las molestias durante la toma de muestra de sangre son mínimas; en algunas ocasiones el procedimiento para tomarle una muestra de sangre puede causar un poco de dolor o una discreta molestia, es posible que se le pueda formar un moretón.

En cuanto a la toma de la biopsia:

Ésta será tomada de una zona de piel que se encuentre afectada por una lesión de psoriasis al momento de su consulta. La biopsia es un procedimiento necesario para confirmar el diagnóstico y siempre se realiza. Adicionalmente se obtendrá, si usted está de acuerdo, una biopsia de piel no lesionada en un sitio lejano a la zona de lesión.

**No necesita presentarse en ayuno** o con alguna preparación especial, también es probable que presente dolor o ardor al momento de colocar la anestesia y nos tomará aproximadamente 20-30 min; este procedimiento deja una cicatriz permanente en el sitio.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, de cualquier manera recibirá la atención médica que suele recibir en su

institución hospitalaria. Ésto es, no afectará su relación con la misma y tampoco afectará su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en momento que quiera no modificará de ninguna manera la atención médica que se le brinda.

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

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

El equipo de investigadores, su médico en el Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua, su médico familiar y las personas que estén involucradas en el cuidado de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información que usted nos proporcione durante su participación en este estudio. Sólo proporcionaremos su información si fuera necesario para proteger sus derechos o su bienestar (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si lo requiere la ley.

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

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

En caso de presentarse alguna molestia o complicación relacionada con la toma de la muestra de sangre o la biopsia, deberá comunicarse con su médico Dermatólogo (a), quien le brindará la atención médica necesaria en caso de ser necesario.

Dermatólogo (a): \_\_\_\_\_

Centro Hospitalario: \_\_\_\_\_

Número de contacto: \_\_\_\_\_

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables del Comité de Ética e Investigación del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua, a los Tel. 55387033 , de 9 a 16:00 hrs.

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

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

---

Nombre del Participante

---

Firma del Participante

---

Fecha

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

---

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

---

Firma del encargado de obtener el CI

---

Fecha

### **Firma de los testigos**

Mi firma como testigo certifica que él/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

---

Nombre del Testigo 1

---

Parentesco con participante

---

Firma del Testigo

---

Fecha

---

Nombre del Testigo 2

---

Parentesco con participante

---

Firma del Testigo

---

Fecha

## II. Soluciones

### Medio RPMI 1640 suplementado (1L)

Suero fetal bovino 10%.....	100 mL
HEPES 1M.....	25 mL
Aminoácidos no esenciales.....	10 mL
Piruvato de sodio.....	10 mL
L-glutamina.....	10 mL
Penicilina/estreptomicina.....	10 mL
Ciprofloxacina.....	7.5 mL
2-β-mercaptoetanol.....	100 µL

### PBS (1L, 1x)

NaCl.....	8.2 g
KCl.....	0.156 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.342 g

### Buffer de FACS

PBS 1x  
EDTA 5 mM  
Suero de caballo 2% v/v

### III. Abreviaturas

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BSA: Albúmina sérica bovina.

CD: Célula dendrítica.

CCR: Receptor de quimiocinas CC.

CCL: Ligandos de quimiocinas CC

CXCR: Receptor de quimiocinas CXC.

CXCL: Ligando de quimiocinas CXC.

CLA: Antígeno linfocitario cutáneo.

CPA: Células presentadoras de antígeno.

CTLA: Antígeno asociado a linfocitos T citotóxico.

EAE: Encefalomielitis autoinmune experimental.

EDC: Complejo de diferenciación epidermal.

FMO: Fluorescencia menos uno.

FSC-A: Dispersión frontal-área.

FSC-H: Dispersión frontal-altura.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.

ICAM: Molécula de adhesión intercelular.

IFN: Interferón.

IL: Interleucina.

ILC: Células linfoides innatas.

ILC2: Células linfoides innatas grupo 2.

ILC3: Células linfoides innatas grupo 3.

iTreg: T reguladoras inducibles.

LFA: Antígeno asociado a la función leucocitaria.

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad.

NK: Asesina natural.

nTreg: T reguladoras naturales.

PASI: Índice de área y severidad de la psoriasis.

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos.  
PSORS: Locus de susceptibilidad a psoriasis.  
SALT: Tejido linfoide asociado a piel.  
SEB: Enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*.  
SFB: Suero fetal bovino.  
SSC-A: Dispersión lateral-área.  
STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción.  
TCR: Receptor de células T.  
TGF: Factor de crecimiento transformante.  
Th: T cooperadora.  
TLR: Receptor tipo Toll.  
Treg: T reguladoras.  
TNF: Factor de necrosis tumoral.  
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.