



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA POBLACIÓN
LINAJE NEGATIVA CD123⁺ EN SANGRE PERIFÉRICA Y PIEL CON
PROPIEDADES DE CÉLULAS LINFOIDES INNATAS EN INDIVIDUOS
SANOS”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

LUZ MARÍA MORA VELANDIA

**TUTOR: DRA. LAURA C. BONIFAZ ALFONZO
FACULTAD DE MEDICINA**

COMITÉ TUTOR

**DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO, INST. DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES, FES IZTACALA**

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Laura C. Bonifaz Alfonso.

El proyecto se realizó con financiamiento del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (número de proyecto R-2008-3601-62-FIS/IMSS/PROT/G11/939). Durante el desarrollo del proyecto de tesis, la sustentante fue becaria CONACYT con número de registro 262112.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi hogar académico y brindarme las bases de mi formación profesional, contribuir con mi formación personal y permitirme conocer a fondo el mundo científico.

A la Dra. Laura Bonifaz, por todo el apoyo, tiempo y esfuerzo dedicado al proyecto. Por todas las enseñanzas y asesorías brindadas. Por ser parte fundamental de mi formación profesional y compartir conmigo su gran amor por la ciencia.

A mi comité tutorial: Dr. Enrique Ortega Soto y Dr. Luis I. Terrazas Valdés por el tiempo, apoyo y asesorías brindadas a lo largo del desarrollo del proyecto y por contribuir a mi formación científica.

A los miembros del jurado: Dra. Bertha Espinoza, Dra. Paula Licon, Dra. Ma. Del Carmen Jiménez, Dr. Jesús Martínez y Dra. Laura Bonifaz por el tiempo para conocer y revisar este trabajo, y por las observaciones hechas para enriquecer el mismo.

A todos los miembros de la UIMIQ, por todo el apoyo, ayuda, consejos, risas y todos los momentos compartidos, gracias por su gran amistad. Gracias en especial al cDr. Octavio Castro por todo el apoyo y por compartir y enriquecer este trabajo.

La ciencia no es sólo una disciplina de razón, sino también de romance y pasión.

Stephen Hawking

En la vida, no hay nada que temer, solo hay que comprender.

Marie Curie

*La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una
llegada.*

Karl Raiumd Popper.

Lo importante es no dejar de hacerse preguntas.

Albert Einstein

INDICE

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	III
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	IV
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.	5
1.2 ORIGEN Y DESARROLLO.....	5
1.3 DESARROLLO DE ILC EN HUMANO.	7
1.4 MODELOS DE DIFERENCIACIÓN Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ASOCIADOS.	10
1.4.1 Etapa 1: Generación y compromiso de linaje ILC.	10
1.4.2 Etapa 2: Diversificación de los tres principales grupos de ILC.	14
1.4.3 Etapa 3: Homeostasis de ILC en tejidos.....	17
1.5 LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE ILC.	19
1.5.1 nks e ILC1:.....	19
1.5.2 ILC2:	21
1.5.3 ILC3:	23
1.5.4 ILC no-convencionales o ILC-like.....	28
1.6 PLASTICIDAD DE ILC.....	28
1.7 PAPEL DE LAS ILC EN LA RESPUESTA INMUNE EN EL HUMANO.	31
1.8 IL-7 DURANTE EL DESARROLLO DE LAS ILC.....	34
1.9 IL-3 Y LA REGULACIÓN DE NFIL3.....	35
2. JUSTIFICACIÓN.....	38
3. HIPÓTESIS	39
4. OBJETIVOS.....	39
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	39
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (CMSP).	40
5.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE PIEL.....	40
5.3 CITOMETRÍA DE FLUJO:.....	40
5.4 RT-PCR CUANTITATIVO.	42
5.5 ENSAYOS DE ACTIVACIÓN CELULAR.	43

5.6 ENSAYO DE ENTRECruzAMIENTO CON IGE.	43
5.7 INMUNOFLORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL.....	43
6. RESULTADOS.....	45
6.1 IDENTIFICACION DE UNA POBLACION LIN ⁻ CD123 ⁺ CD127 ^{LOW} CON CARACTERISTICAS COMPARTIDAS DE CELULAS LINFoidES Y BASOFILOS EN SANGRE PERIFERICA.	45
6.2 LA POBLACION LIN ⁻ CD123 ⁺ CD127 ^{LOW} (FSC ^{LOW} SSC ^{LOW}) DE SP EXPRESA MULTIPLES MARCADORES DE ILCS INCLUYENDO EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL ID2.....	49
6.3 LA IL-3 INCREMENTA LA SOBREVIDA Y REGULA LA EXPRESION DE NFIL3 EN LA POBLACION LIN ⁻ CD123 ⁺ CD127 ^{LOW}	51
6.4 LA POBLACION LIN ⁻ CD123 ⁺ CD127 ^{LOW} EN SP PRESENTA PRINCIPALMENTE UN FENOTIPO TIPO ILC2, Y CO-EXPRESA LOS FACTORES T-BET Y RORGT.	53
6.5 LA POBLACION LIN ⁻ CD123 ⁺ CD127 ^{LOW} DE SP EXPRESA DIVERSAS CITOCINAS TIPO TH.	55
6.6 LA POBLACION LIN ⁻ CD123 ⁺ CD127 ^{LOW} EN SP PRODUCE ADICIONALMENTE IL-8.....	58
6.7 LA POBLACION LIN ⁻ CD123 ⁺ CD127 ^{LOW} PROVENIENTE DE LA REGION LINFoIDE DISMINUYE LA EXPRESION DE CD123 Y DE MARCADORES DE BASOFILOS DESPUES DE ACTIVACION.	60
6.8 LA POBLACION LIN ⁻ CD123 ⁺ CD127 ^{LOW} EXPRESA MARCADORES INVOLUCRADOS CON EL RECLUTAMIENTO A TEJIDOS PERIFERICOS COMO PIEL.	62
6.9 LA POBLACION LIN ⁻ CD123 ^{LOW} CD127 ^{INT} CON CARACTERISTICAS DE ILC SE ENCUENTRA NORMALMENTE INFILTRANDO TEJIDOS COMO LA PIEL.	64
6.10 LAS CELULAS LIN ⁻ CD123 ^{LOW} CD127 ^{INT} DE PIEL PRODUCEN IL-17 E IL-22.....	66
7. DISCUSION.....	68
8. CONCLUSIONES.	79
9. BIBLIOGRAFIA.....	80
10. ANEXOS.....	88

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1. Desarrollo de ILC a partir de precursores linfoides.....	9
Figura 2. Modelo de las etapas de diferenciación de ILC.	18
Figura 3. Clasificación de subpoblaciones de ILC.....	27
Figura 4. Identificación de dos poblaciones “linaje negativas” (Lin-) en SP con expresión diferencial de CD127.....	47
Figura 5. La población Lin- CD123+ CD127 ^{low} presente en SP presenta características compartidas con basófilos y células linfoides.....	48
Figura 6. La población Lin- CD123+ CD127 ^{low} (FSC ^{low} SSC ^{low}) de SP expresa múltiples marcadores de ILCs incluyendo el factor transcripcional ID2.	50
Figura 7. La IL-3 es capaz de incrementar la sobrevivencia y regular la expresión de factores transcripcionales tipo ILC de la población Lin- CD123+ CD127 ^{low}	52
Figura 8. La población Lin- CD123+ CD127 ^{low} en SP presenta principalmente un fenotipo tipo ILC2, con co-expresión de los factores T-bet y ROR γ t.....	54
Figura 9. La población Lin- CD123+ CD127 ^{low} de SP expresa diversas citocinas tipo Th.	56
Figura 10. Las poblaciones Lin- CD123+ y Lin- CD127+ de SP, responden a IL-15 e IL-18 mediante la producción de IFN γ	57
Figura 11. La población Lin- CD123+ CD127 ^{low} en SP produce adicionalmente IL-8.....	59
Figura 12. La población Lin- CD123+ CD127 ^{low} proveniente de la región linfoide disminuye la expresión de CD123 y de marcadores de basófilos después de activación	61
Figura 13. La población Lin- CD123+ CD127 ^{low} expresa marcadores involucrados con el reclutamiento a tejidos periféricos como piel.	63
Figura 14. La población Lin- CD123 ^{low} CD127 ^{int} con características de ILC se encuentra normalmente infiltrando tejidos como la piel.	65
Figura 15. Las células Lin- CD123 ^{low} CD127 ^{int} de piel producen IL-17 e IL-22.	67
Figura 16. La población Lin- CD123 ^{low} CD127 ^{int} presente en SP y piel de individuos sanos posee características de ILC.....	78
Figura suplementaria 1. Subpoblaciones de ILC identificadas en sangre de cordón umbilical.	88
Figura suplementaria 2. Estrategia de análisis y purezas obtenidas después del aislamiento de poblaciones por citometría de flujo.....	89
Figura suplementaria 3. Expresión de NFIL3, TOX y PLZF en respuesta a IL-3.....	89
Tabla 1. Anticuerpos empleados en tinciones de superficie e intracelulares.	90
Tabla 2 y 3. Estímulos para cultivo celular	93

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AhR: Receptor de Aril Hidrocarburos

BCR: Receptor de Linfocitos B.

BDCA: Antígeno de Células Dendríticas de Sangre (del inglés: Blood Dendritic Cell Antigen).

cDC: Células Dendríticas Convencionales.

CLA: Antígeno Linfocitario Cutáneo.

CLP: Precursor Linfoide Común.

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica.

CRTH2: (del inglés: Chemoattractant Receptor-Homologous Molecule expressed on Th2 cells o Prostaglandin D₂ receptor 2).

FT: Factor de Transcripción

GATA-3: Trans-acting T-cell-specific transcription factor.

GM-CSF: Factor estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos.

HLA: Antígeno Leucocitario Humano (Del inglés: Human Leukocyte Antigen)

HLA-DR: Antígeno Leucocitario Humano relacionado al antígeno D (del inglés: Human Leukocyte Antigen-antigen D Related).

ID2: Inhibidor 2 de unión a ADN.

IL: Interleucina.

ILC: Células Linfoides Innatas.

JAK: Cinasas asociadas Janus (del inglés: Janus associated Kinases).

MALT: Tejido Linfoide Asociado a Mucosas

NCR: Receptores Naturales de Citotoxicidad. (del inglés: Natural Cytotoxicity Receptors).

NFIL3: Factor Nuclear regulado por IL-3. (del inglés: Nuclear Factor, IL-3 regulated).

NK: Células Asesinas Naturales (del inglés: Natural Killer Cells)

pDC: Células Dendríticas Plasmacitoides.

PLZF: del inglés: Promyelocytic Leukemia Zinc Finger.

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato.

ROR- γ t: Receptor huérfano gamma-t relacionado al ácido retinoico; (del inglés: RAR-related orphan receptor gamma)

STAT: Señal Transductora y Activadora de la Transcripción. Del inglés: Signal Transducer and Activator of Transcription

SP: Sangre periférica.

T-bet: T-box transcription factor.

TCR: Receptor de Linfocitos T.

TCF-1: Factor de células T- 1 (del inglés: T-cell factor 1).

Th: Linfocito T cooperador.

TOX: Del inglés: Thymocyte selection-associated high-mobility group box protein.

TSLP: Linfopoyetina Estromal Tímica.

RESUMEN

Las células linfoides innatas (ILC) son miembros de una familia heterogénea de origen linfoide que comparten características funcionales con los linfocitos T cooperadores (Th) y T citotóxicos (Tc), pero que se clasifican como parte de la inmunidad innata. Se ha descrito que estas células se encuentran involucradas en respuestas tempranas mediadas por citocinas en tejidos periféricos. Diversos estudios, hechos principalmente en ratón, han demostrado su gran diversidad funcional al participar en la protección contra infecciones, mantenimiento de la integridad tisular, exacerbación de respuestas inflamatorias e inclusive en cáncer. Sin embargo, los estudios hechos en humano, han mostrado la existencia de una mayor diversidad fenotípica y funcional de subpoblaciones de ILC que lo reportado en ratón, por lo cual sus funciones dentro de la respuesta inmune innata aún no han logrado definirse por completo.

Si bien se ha descrito que las ILC clásicas normalmente expresan CD127 (IL-7R α), recientemente, ha sido reportada la presencia de poblaciones de ILC no-clásicas CD127⁻ así como también la existencia del denominado EILP (Early Innate Lymphoid Progenitor) el cual posee una expresión baja de dicho marcador. La ontogenia y desarrollo de esta estirpe celular ha sido investigada predominantemente en modelos murinos; sin embargo, en humano se ha descrito la expresión de diversos factores transcripcionales compartida con ratón, entre ellos: NFIL3 (Factor Nuclear regulado por IL-3), el cual ha sido reportado como crucial para el desarrollo de ILC en respuesta a IL-7. El receptor de IL-3 (CD123) es comúnmente utilizado para excluir basófilos y células dendríticas plasmacitoides (pDCs) durante la identificación de ILC; sin embargo, hasta el momento se desconoce si en respuesta a IL-3, NFIL3 también es capaz de inducir características tipo ILC en células Lin⁻ CD123⁺. Adicionalmente, aún se conoce muy poco acerca de la expresión de moléculas relacionadas con la migración hacia tejidos periféricos en células con características de ILC presentes en sangre periférica (SP), y si dichas moléculas pueden mediar su redistribución hacia tejidos tales como la piel.

En el presente trabajo hemos identificado una población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}} \text{CD7}^+ \text{CLA}^+$ presente en SP de individuos sanos, esta población comparte características fenotípicas con los basófilos, pero a su vez expresa diversos factores transcripcionales y marcadores fenotípicos compartidos con las ILC clásicas. Adicionalmente esta población presente en SP posee una alta expresión de moléculas involucradas con el reclutamiento a piel (CLA, CXCR4), lo cual en conjunto con la identificación de una población equivalente $\text{Lin}^- \text{CD123}^{\text{low}} \text{CD127}^+$ presente en la dermis de individuos sanos, sugiere que las células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ pueden redistribuirse a tejidos periféricos, en específico a la piel.

ABSTRACT

Innate lymphoid cells (ILC) are members of a heterogeneous family of lymphoid origin that share functional features with T helper cells (Th) and cytotoxic T cells (Tc), but that are classified as part of the innate immunity. It has been described that these cells are involved in early cytokine-mediated responses in peripheral tissues. Several studies, mainly in mice models, have confirmed their high functional diversity, participating in the protection against pathogens, maintenance of tissue integrity, exacerbation of inflammatory responses and even in cancer. Nevertheless, human studies have shown the existence of even a major phenotypic and functional diversity of ILC subpopulations compared to mice models, reason why their role as part of innate immunity has not been fully elucidated.

Even though it has been described that classic ILC usually express CD127 (IL-7R α), recently, the presence of non-classic CD127⁻ ILC populations and an early ILC precursor (EILP) CD127^{low} has been reported. The ontogeny and development of ILC has predominately been investigated in mouse models. However, the expression of different transcription factors shared with these models, have been described for ILC identification in humans; such as NFIL3 (nuclear factor, IL-3 regulated) which is crucial for ILC development in response to IL-7. IL-3R α (CD123) is usually used to exclude basophils and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) during ILC identification, however, it is unknown if in response to IL-3, NFIL3 could be relevant to induce ILC features in Lin⁻ CD123⁺ populations. In addition, little is known about whether peripheral blood (PB) populations with ILC features express specific homing molecules that might mediate their migration into peripheral tissues such as skin.

Here, we report a Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} CD7⁺ CLA⁺ population present in PB that share some phenotypic properties with basophils, but that also expresses several transcriptional factors and phenotypic markers shared with classic ILC. In addition, this PB population highly expresses homing molecules (CLA, CXCR4), involved in the recruitment into the skin; overall the identification of an equivalent population Lin⁻ CD123^{low} CD127⁺ in the dermis from healthy donors, suggests that the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} cells can be redistributed from PB to peripheral tissues, in specific in to the skin.

1. INTRODUCCIÓN

La familia de las células linfoides innatas (ILC), clasificadas actualmente como parte del linaje linfoide, está compuesta por diferentes subpoblaciones las cuales presentan características fenotípicas y funcionales muy diversas. Las primeras células consideradas como parte de este linaje fueron las Natural Killer (NKs). Sin embargo, durante los últimos años diversos grupos de investigación han reportado la presencia de células con características linfoides en diversos tejidos; por ejemplo, en tejido asociado a mucosas (MALT), piel, órganos linfoides secundarios, entre otros. En general estas células poseen características compartidas como: 1) se localizan principalmente en tejidos periféricos, 2) no poseen receptores clonales (tipo BCR o TCR), 3) su activación es mediada principalmente por otras citocinas producto de otras células como: macrófagos, células dendríticas e incluso células epiteliales y estromales y 4) Requieren de IL-7 para su diferenciación. Hasta el momento estas células han sido subclasificadas en tres grupos: ILC1, ILC2 e ILC3, de acuerdo a la expresión de diversos marcadores de superficie, y factores de transcripción asociados a su vez con el desarrollo y función de cada subpoblación.

Durante los últimos años (gracias principalmente a los modelos murinos), ha sido posible empezar a esclarecer los mecanismos de activación y ontogenia de las ILC; sin embargo, los estudios más recientes hechos en humano, han demostrado que existen diferencias entre la diversidad de poblaciones, funciones y ontogenia de estas células entre ambos organismos. De acuerdo a esto, a continuación se describen las características generales de esta estirpe celular haciendo énfasis en las similitudes y diferencias encontradas hasta el momento en humano y ratón.

1.1 Características generales.

De acuerdo al creciente número de trabajos en donde se han descrito diversas subpoblaciones de ILC, se han tratado de definir los principales criterios que deben cumplir estas nuevas subpoblaciones, dentro de los cuales se encuentran: 1) Las ILC se originan a partir de un progenitor linfoide común (CLP), 2) presentan morfología linfoide clásica, 3) poseen una alta expresión del factor de transcripción ID2, 3) Expresan comúnmente CD127 (IL-7R α) y CD132 (cadena γ común), 4) no expresan marcadores específicos de linaje de linfocitos B (CD19), linfocitos T (CD3), células dendríticas (CD11c, BDCA-2), macrófagos (CD14) y granulocitos (Fc ϵ R), debido a esto las ILC son consideradas como células “Linaje Negativas” (Lin $^{-}$). Sin embargo a pesar de la existencia de estos criterios generales, y debido a la gran heterogeneidad de subpoblaciones descritas en tejidos periféricos, así como a la aparente redundancia funcional de algunas de ellas y la expresión compartida de factores transcripcionales involucrados en el desarrollo de linfocitos T (incluyendo Notch, GATA-3, TCF-1 and Bcl11b)¹, es posible que el criterio de identificación actual sea modificado para poder incluir nuevas poblaciones de ILC.

1.2 Origen y desarrollo

Las ILC al ser consideradas como leucocitos, tienen como origen a las células troncales hematopoyéticas (CTH), a partir de las cuales se generan los precursores mieloides y linfoides comunes (CMP y CLP), este último a su vez origina al precursor directo de ILC. El desarrollo de ILC en ratón, se inicia en el hígado fetal y posteriormente en la médula ósea, a partir de CLPs caracterizados como Lin $^{-}$, Thy-1 $^{-}$, Sca1^{lo}, c-Kit^{lo}, Flt3⁺, IL-7R α ⁺. Tanto en médula ósea como en hígado fetal de ratón ha sido identificado un progenitor “más restringido” identificado como: Lin $^{-}$ IL-7R α ⁺, α 4 β 7⁺, CD25⁻, CXCR6⁺ y ha sido denominado como CILP (Progenitor Común de ILC) o α LP; este no es capaz de dar origen a linfocitos B y T, pero puede generar todas las subpoblaciones de ILC incluyendo a las células NK. El compromiso temprano hacia el linaje de ILC en ratón, requiere además de la expresión del factor 1 de células T (TCF-1), del inhibidor de unión a DNA 2 (ID2) y del factor nuclear regulado por IL-3 (NFIL3); se ha demostrado que la ausencia de estos afecta considerablemente la cantidad de prácticamente todas las ILC en diversos tejidos². Adicionalmente se ha descrito que la diferenciación de todas las ILC a partir

del CLP, requiere de TOX (thymocyte selection-associated high mobility group box protein). A pesar de la descripción del α LP como el progenitor más temprano de ILC, datos recientes obtenidos por secuenciación de células individuales (a partir del α LP) han mostrado que este compartimento celular es mucho más heterogéneo y complejo de lo que se pensaba, ya que se ha encontrado un amplio espectro de intermediarios celulares, incluyendo a precursores de diversas poblaciones de ILC con diferentes grados de compromiso³.

Adicionalmente al α LP, y gracias a la utilización de ratones repoteros para TCF-1 ($Tcf7^{Gfp/+}$), se ha descrito al progenitor temprano de ILC, TCF-1⁺, denominado como EILP: Early Innate Lymphoid Progenitor, el cual tiene la capacidad de dar origen a todas las subpoblaciones de ILC (incluyendo a las NK), este progenitor se ha identificado como $\alpha 4\beta 7^+$, CD90⁻, CD122⁻, CD25⁻, CXCR6⁻ y se caracteriza también por la baja expresión del IL-7R α ⁴. A pesar de que se ha demostrado que el EILP, aún retiene cierto potencial de diferenciación hacia células dendríticas, es considerado hasta el momento como el progenitor más temprano de ILC, el cual no puede dar origen a linfocitos del sistema inmune adaptativo. De manera interesante el EILP, expresa niveles altos de TCF-1, TOX y NFIL3 y posee baja expresión de ID2⁵. Es importante resaltar que debido a la baja expresión de IL-7R α observada en el EILP, y la cual se ha considerado como esencial en la diferenciación de ILC, aún se encuentra en discusión si este es parte de una vía alternativa para el desarrollo de ILC y por lo tanto existe otro progenitor temprano IL-7R α^+ contenido dentro del compartimento del α LP.

En orden jerárquico después del EILP, se ha identificado al precursor de células NK (NKP) y adicionalmente a células precursoras: ID2⁺, IL-7R α^+ , $\alpha 4\beta 7^+$, CD90⁺, CD25⁻, PLZF^{+/-}, las cuales pueden diferenciarse hacia ILC1, ILC2 e ILC3, pero que han perdido la capacidad de generar linfocitos B, T y células NK, debido a esto se han denominado como CHILPs (Common Helper Innate Lymphoid Cell Precursors). En resumen, en ratón el desarrollo de ILC procede del CLP, posteriormente al CILP (o α LP) que a su vez contiene al EILP, posteriormente se da lugar al NKP y al CHILP, los cuales finalmente se diferencian hacia los precursores de cada subgrupo de ILC. En la figura 1 se muestra la propuesta actual de diferenciación de ILC a partir de los estudios hechos en ratón.

1.3 Desarrollo de ILC en humano.

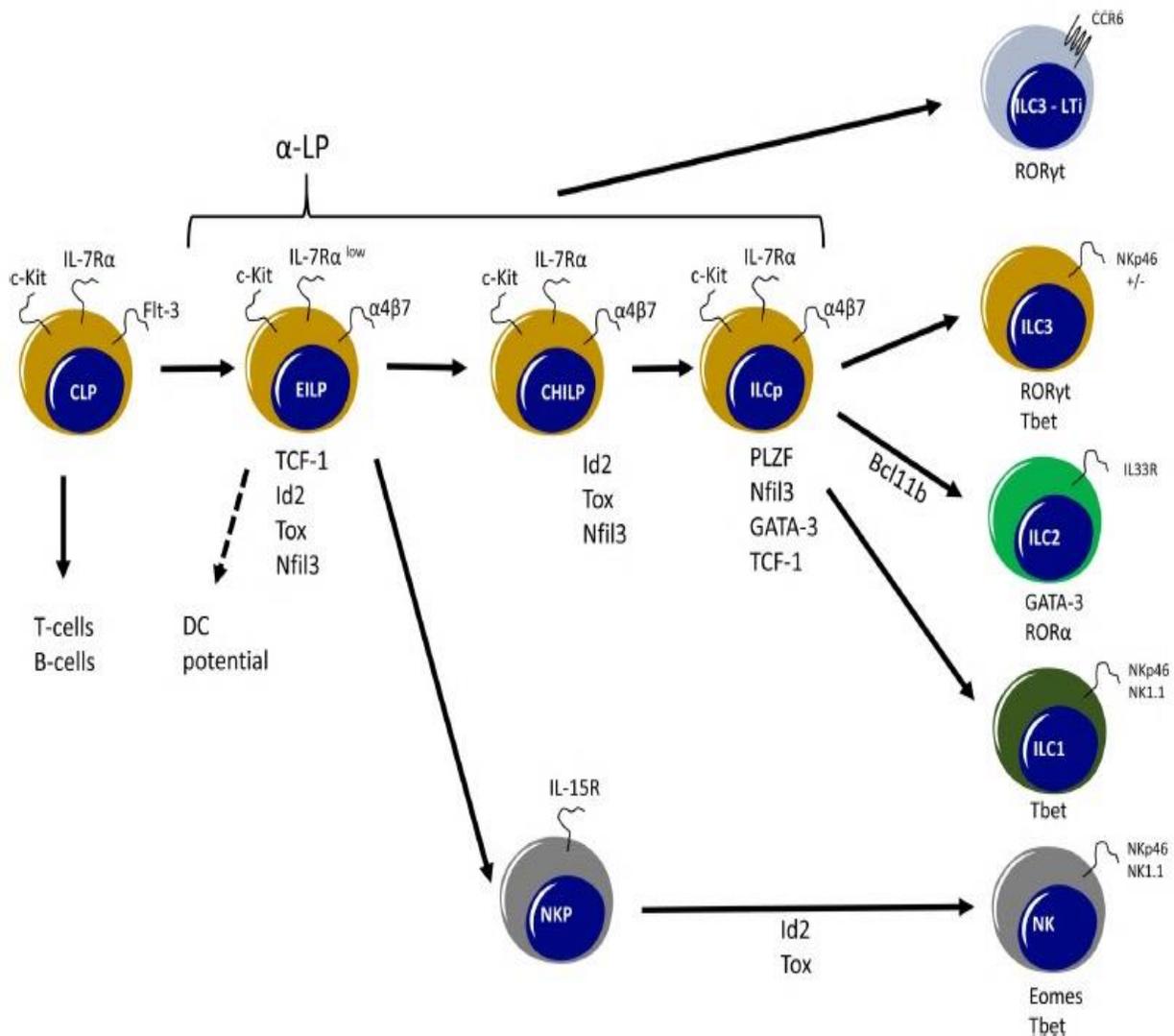
En humano, el orden jerárquico de diferenciación hematopoyético se encuentra menos caracterizado, se ha sugerido que la población de CLP se encuentra enriquecida a su vez por células progenitoras hematopoyéticas (HPC) Lin⁻ tanto CD34⁺ como CD38⁺ (CD45RA⁺ CD10⁺); incluyendo: CD34⁺ CD24⁻ CD10⁺ o CD34⁺ CD38⁻, CD7⁺ o CD34⁺ CD45RA⁺. Adicionalmente, el análisis clonal *in vivo* de la hematopoyesis en primates no humanos, así como la evidencia en donde se sugiere que el el CLP mantiene cierto potencial de diferenciación hacia el linaje mieloide apoyan la idea de que en humano no existe una restricción tan estricta en la bifurcación de linajes mieloide y linfoide ².

Los primeros precursores en ser descritos fueron los NKPs los cuales se identificaron en hígado fetal, médula ósea, cordón umbilical y amígdalas. Por otra parte, los precursores de ILC3 (ILC3P) han sido también identificados en amígdalas y lamina propria, pero no en timo o médula ósea. Adicionalmente, ha sido descrito recientemente que ILCPs RORγt⁺ presentes en amígdalas pueden dar origen a ILC citotóxicas y de tipo cooperador. Estos precursores descritos (NKP, ILC3P y RORγt⁺ ILCPs) se caracterizaron por ser CD34⁺ y encontrarse en mayor proporción en tejidos linfoides secundarios; sin embargo, no logró detectarse su presencia en circulación; adicionalmente no ha sido posible establecer si existe alguna relación entre estos precursores CD34⁺ y las poblaciones residentes de ILC en tejidos ^{2,3}.

Este año ha sido reportada la identificación y caracterización de un precursor de ILC presente en sangre periférica y tejidos. Esta población ha sido identificada como: Lin⁻, CD7⁺, CD127⁺, c-Kit⁺; y a diferencia de las ILC3 “clásicas” (identificadas también por la expresión de c-Kit), esta población no expresa NKp44 ni RORγt; y después de ser estimulada no es capaz de producir IL-17 e IL-22. Dentro de esta población se encuentran contenidos precursores (ILCPs) multi y uni potentes que pueden dar origen tanto *in vitro* como *in vivo*, a todas las subpoblaciones de ILC (incluyendo a las células NK Eomes⁺). El potencial precursor de estas células ha sido demostrado utilizando un sistema de cultivo con células estromales OP-9 (análisis de alrededor de 1300 cultivos clonales), y un modelo de diferenciación *in vivo* con ratones humanizados, en ambos modelos se ha observado que la población de ILCP identificada, es capaz de dar origen a

todas las subpoblaciones de ILC; de manera interesante, se demostró también que el desarrollo de ILC maduras en ambos modelos requiere de las citocinas: IL-2, IL-7 e IL-1 β . La identificación de esta población de ILCP tanto en circulación como en tejidos periféricos, apoya la teoría de que los ILCPs son una fuente de ILC, que pueden diferenciarse *in situ* dependiendo de las señales locales ⁶.

Finalmente, es importante destacar que a pesar de que los linfocitos T y las ILC tienen como origen el CLP, y que comparten programas transcripcionales durante el proceso de diferenciación; ha sido propuesto que estas dos estirpes celulares completan su diferenciación y diversificación en distintos sitios anatómicos; para los linfocitos T estos sitios incluyen el timo (para la selección negativa y positiva) y los ganglios linfáticos (para la polarización Th1, Th2, Th17). Por otra parte, para las ILC, la médula ósea es el sitio primordial en donde se da origen a los principales precursores de estas células (NKPs, CHILPs, etc.) y en donde se propone se comprometen hacia linaje de ILC1, ILC2 o ILC3 y su diferenciación final o polarización parece requerir de señales específicas del tejido blanco donde residen⁷.



Gronke K. et. al. Immunology Letters 179 (2016).

Figura 1. Desarrollo de ILC a partir de precursores linfoides.

Los Progenitores Tempranos de ILC (EILP) se desarrollan a partir de los Progenitores Linfoides Comunes (CLP) en médula ósea e hígado fetal. Los EILP no poseen potencial de dar origen a linfocitos T o B, pero pueden diferenciarse hacia cualquier subpoblación de ILC, y además retienen potencial de diferenciación hacia células dendríticas (DC). Los EILP conforman una subpoblación de α LP, la cual es una población heterogénea de progenitores linfoides Flt3⁻ y que se caracteriza por la expresión de la integrina α 4 β 7 y de IL-7R α (CD127). Río abajo del EILP, es posible encontrar a los precursores de ILC citotóxicos: el precursor de NKs (NKP) y adicionalmente al precursor de ILC de tipo cooperador (CHILP), el cual adquiere la expresión de PLZF y en esta etapa es capaz de dar origen a las todas las subpoblaciones de ILC1, ILC2 e ILC3 exceptuando a las células LTi.

1.4 Modelos de diferenciación y factores de transcripción asociados.

La complejidad y semejanza en el requerimiento de factores de transcripción involucrados en el desarrollo de ILC y linfocitos T, ha llevado a la propuesta de un modelo de diferenciación de las ILC, en la cual el compromiso hacia este linaje es adquirido durante un proceso dividido en tres etapas principales: 1) Generación y mantenimiento de los progenitores comunes de ILC, 2) La diversificación de dichos precursores en tres grupos principales y 3) el mantenimiento y regulación de las distintas subpoblaciones en tejidos periféricos⁷; estas etapas principales se resumen en la figura 2.

1.4.1 Etapa 1: Generación y compromiso de linaje ILC.

Los modelos de ratón han permitido identificar células linaje negativas en hígado fetal, intestino fetal y médula ósea adulta, los cuales expresan la integrina $\alpha 4\beta 7$ ⁸. Durante esta etapa está incluida la diferenciación de los denominados EILP, α LP y CHILPs, originados a partir de los CLP. Los principales factores de transcripción involucrados en esta etapa y sus respectivas funciones se resumen a continuación:

ID2: Es miembro de la familia “ID” de represores transcripcionales, los cuales regulan un amplio número de procesos de diferenciación celular en diversos organismos. Las proteínas ID carecen de un dominio de unión a DNA, por lo cual no son capaces de mediar por si mismas la transcripción génica; pero pueden hacerlo indirectamente al unirse a una serie de activadores transcripcionales denominados como “proteínas E”, en donde se incluyen a E2A, E2-2 (también conocida como TCF3) y HEB (también conocida como TCF12)⁷. Dentro del sistema hematopoyético ID2 es expresado por diversos linajes y su eliminación tiene diversos efectos en la diferenciación tanto de células linfoides como mieloides^{9,10}. Se ha reportado que los CLP no expresan ID2 o poseen una baja expresión, se ha propuesto a las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) como los reguladores más probables de dicha expresión, ya que son capaces de activar la vía de SMAD la cual se ha observado que regula directamente la transcripción de ID2 en algunas estirpes celulares¹¹, sin embargo la regulación directa de BMPs sobre el desarrollo de ILC aún no ha sido descrito. No obstante, hay evidencias que sugieren fuertemente que una alta

expresión de ID2 en precursores linfoides se relaciona con la restricción hacia el linaje de ILC, dichos precursores se han caracterizado como ID2⁺ PLZF^{+8,12}.

PLZF: El represor transcripcional PLZF (Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger) codificado por *Zbtb16*, es crucial en la diferenciación de subpoblaciones de linfocitos T, en particular de las células NKT¹³. Estudios en ratón han demostrado que todas las ILC exceptuando a las NK y las células inductoras de tejido linfoide (LTis, consideradas dentro del grupo de ILC3), requieren del represor PLZF para su diferenciación⁸. Se ha descrito también que la expresión de PLZF es característico en la etapa de CHILP sin embargo, aún no está claro cómo se regula su expresión en esta etapa de precursores. El papel de PLZF dentro de la diferenciación de ILC fue demostrada utilizando ratones *Zbtb16*CreGFP, en los cuales se observó que tanto en hígado fetal como en médula ósea se encontraban presentes precursores de ILC PLZF⁺. Sin embargo, se determinó que los ratones deficientes de *Zbtb16* solo presentaban defectos parciales en la diferenciación hacia ILC1 e ILC2, por lo cual se descartó que PLZF fuera esencial entre la transición del CLP hacia ILCs⁷.

NFIL3: El factor nuclear regulado por IL-3, también conocido como E4BP4, es un factor de transcripción el cual controla diversos procesos celulares, entre los cuales se encuentran: la transcripción de IL-3 en linfocitos T¹⁴, el cambio de isotipo de inmunoglobulinas, así como la supervivencia de linfocitos B^{15,16}, el desarrollo de células dendríticas y macrófagos^{17,18}, la modulación de la respuesta tipo Th2 y la regulación de la respuesta Th17 mediada por ciclo circadiano¹⁹. Dentro del desarrollo de ILC, el papel de NFIL3 como regulador maestro de este proceso, ha sido reportado por diversos trabajos²⁰⁻²³; en uno de ellos se describió que el progenitor de ILC originado a partir del CLP, presente en médula ósea y caracterizado por la expresión de CXCR6 y $\alpha 4\beta 7$ depende directamente de NFIL3 para su desarrollo. En este mismo trabajo se ha propuesto que el mecanismo principal por el cual NFIL3 controla el desarrollo de ILC es regulando la expresión de TOX (Thymocyte selection-associated high-mobility group box protein)²², cuyo papel en el desarrollo de ILC se discutirá más adelante. Por otra parte, también se ha descrito que la expresión de NFIL3 en precursores linfoides es regulada por la IL-7, y que a su vez este factor es capaz de modular la expresión de ID2 en los denominados

CHILPs²³. Cabe resaltar que el papel de NFIL3 en la diferenciación del EILP no ha sido evaluado.

TOX: Thymocyte selection-associated high-mobility group box protein. Es miembro del grupo de proteínas de alta movilidad (HMG). Contiene un dominio de unión a ADN, y es requerido durante el desarrollo de linfocitos T, células NK, NKT y células inductoras de tejido linfoide (LTi)²⁴⁻²⁶. Se ha propuesto que la inducción de la expresión de TOX mediada por NFIL3 está asociada también con el desarrollo de ILC y que es necesario para el desarrollo de NKs y LTis en médula ósea. Se ha demostrado, que los ratones *Tox*^{-/-} carecen de nódulos linfáticos²⁶ debido al desarrollo inadecuado de células LTi. Lo anterior sugiere que la regulación de la expresión de este FT se lleva a cabo en médula ósea. Además, se ha logrado demostrar en un modelo *in vivo* que la expresión de TOX es necesaria para la diferenciación del CLP hacia células comprometidas con el linaje de ILC; utilizando un modelo *in vitro* se ha conseguido demostrar que la deficiencia de TOX tiene un impacto negativo en la supervivencia y proliferación de células progenitoras de ILC, así como también durante etapas de diferenciación tardías. El análisis transcriptómico comparativo de células progenitoras de médula ósea ha puesto de manifiesto que las células deficientes de TOX son incapaces de regular la expresión de diversos genes relacionados con el programa de ILC, incluyendo genes que son blancos de Notch, lo cual sugiere que TOX es un factor determinante en la especificación temprana del linaje de ILC^{27,28}.

GATA-3: Se ha descrito que este factor de transcripción tiene múltiples funciones durante la diferenciación de los linfocitos T, permite la generación de los progenitores tempranos de este linaje, y está involucrado en la diferenciación de los timocitos durante diversas etapas, además de ser un factor clave en la polarización Th2²⁹. Adicionalmente, GATA-3, también tiene un papel fundamental durante la diferenciación de ILC2, mediante la modulación de la expresión de IL-5 e IL-13^{30,31}, pero también se ha reportado que está involucrado en el desarrollo de subpoblaciones de ILC1 e ILC3^{30,32,33}. Se ha demostrado que el desarrollo de células Lin⁻CD127⁺ en hígado fetal y médula ósea se ve afectado en ausencia de este factor; también se ha observado que no es posible identificar las poblaciones de ILC1 EOMES⁻ y de ILC3 (tanto LTi como NCR⁺) en ausencia de GATA-3³⁴. Debido a esto, se ha propuesto que este FT juega un

papel mucho más importante en el desarrollo de ILC; hasta el momento se ha sugerido que GATA-3 ayuda a separar los linajes de tipo “cooperador” y “citotóxico”³⁵, en parte debido a que el desarrollo de las células ILC1: CD127⁻ EOMES⁺ (identificadas como células NK) presentes en bazo es GATA-3 independiente³⁶ y también debido a que el desarrollo de las NK clásicas no se encuentra afectado. Sin embargo, hay reportes en donde se ha descrito que subpoblaciones de ILC1 EOMES⁺, incluyendo a las células NK tímicas (CD127⁺) dependen totalmente de la expresión de GATA-3 para su desarrollo, por lo cual la relación entre la expresión de este factor y el desarrollo de las diferentes subpoblaciones de ILC parece ser aún más complejo y aún no se ha determinado su relación con otros factores involucrados en este proceso. Los últimos estudios han demostrado que GATA-3 regula la expresión de CD127 en progenitores tempranos de ILC³⁴, por lo cual se ha sugerido que los efectos observados al eliminar GATA-3, están relacionados con una deficiente señalización de IL-7 debido a la baja expresión de su receptor^{7,34}.

TCF-1: El factor 1 de células T (codificado por el gen *Tcf7*) es un factor de transcripción clave durante la etapa temprana del compromiso de linfocitos T^{25,37}. Con respecto al desarrollo de ILC, se ha reportado que TCF-1 es necesario durante el desarrollo de ILC2; los ratones *Tcf1*^{-/-}, carecen de ILC2 y por lo tanto la respuesta mediada por esta subpoblación se encuentra alterada. La cantidad de ILC2 en mucosas se encuentra severamente reducida en estos ratones comparados con los de tipo silvestre y por lo tanto son incapaces de eliminar infecciones de nemátodos, y de responder ante un reto con proteasas en vías aéreas^{4,38}. Adicionalmente, los ratones *Tcf1*^{-/-} presentan un número reducido de ILC3 en lámina propia del intestino delgado (SiLP)³⁸, y la cantidad de células NK se encuentra moderadamente disminuida³⁹. El mecanismo de acción descrito hasta el momento mediante el cual TCF-1 promueve la generación de ILC2 involucra vías GATA-3 dependientes e independientes⁴, pero su relación con otros factores de transcripción aún no es clara.

Por otra parte, ha sido descrito recientemente que mediante la expresión de TCF-1 en médula ósea es posible identificar a los progenitores tempranos de ILC (EILPs). Utilizando un modelo de ratones reporteros para TCF-1, se han identificado a estos progenitores que poseen una alta expresión de este factor, y que no poseen el potencial de dar origen a linfocitos T o B, pero que

pueden diferenciarse a células NK y a todas las poblaciones de ILC de tipo cooperador descritas hasta el momento, por lo cual se ha denominado como el progenitor más temprano de ILC. La sobre expresión de TCF-1 se ha relacionado con el compromiso temprano hacia linaje de ILC^{4,40}, ya que se observado que este factor junto con NFIL3 son necesarios durante la transición de CLP al α LP⁴¹. Sin embargo, el mecanismo por el cual interactúa con otros factores como ID2 o GATA-3 aún no se ha establecido.

1.4.2 Etapa 2: Diversificación de los tres principales grupos de ILC.

Esta etapa se define por la generación de diferentes precursores pre-comprometidos hacia las distintas subpoblaciones de ILC a partir del denominado CHILP, por lo cual se ha propuesto como una etapa de diversificación. A pesar de que se ha definido la participación de diversos factores de transcripción durante este proceso, las señales que dan inicio a la diversificación aún no se encuentran bien definidas. Adicionalmente, se ha planteado que aunque las diferentes poblaciones de ILC y linfocitos T presentan un fuerte paralelismo en lo referente a los factores que guían su desarrollo y diferenciación; existen diferencias claves en el proceso de maduración de estas dos estirpes celulares; por ejemplo, las ILC no necesitan de señales de co-estimulación, ni señalización mediada por el TCR; en cambio, ambos linajes requieren de diversos factores solubles y de la expresión selectiva de factores de transcripción como T-bet (ILC1/Th1), GATA-3 (ILC2/Th2) y ROR γ t (ILC3/Th17) para llevar a cabo la polarización o diversificación de poblaciones⁴². Por otra parte, se ha descrito que existen otros factores de transcripción no típicos, como Bcl11b, Runx3 y Notch que también pueden dirigir el desarrollo temprano de las ILC.

Bcl11b: es un factor de transcripción con dominio de dedo de zinc, el cual funciona como activador/represor y se expresa en respuesta a la señalización mediada por Notch⁴³. Se ha reportado que Bcl11b se expresa específicamente en progenitores comprometidos a ILC2⁴⁴ (y es necesario durante su diferenciación). Bcl11b se expresa en el 28% de los precursores de ILC2 que a la vez expresan ID2 o PLZF. Modelos in vitro e in vivo han demostrado que estos precursores tempranos que expresan Bcl11b únicamente dan origen a ILC2, su inactivación provoca una pérdida completa del desarrollo de ILC2 a partir de progenitores hematopoyéticos^{45,46}. Sin embargo, el mecanismo por el cual Bcl11b direcciona la diferenciación hacia ILC2 aún se desconoce.

Runx3: pertenece a la familia de factores de transcripción relacionados con Runt (RUNX), también conocidos como factores de unión al core (CBF α). Se ha descrito que este factor es importante para la diferenciación de linfocitos T CD8⁺, Th1 y células NK de bazo. Adicionalmente, se ha reportado también que Runx3 se expresa específicamente en ILC1 e ILC3 y no en ILC2. La eliminación específica de *Cbfb* o Runx3 en células NKp46⁺ tiene como consecuencia una reducción significativa de ILC1 e ILC3 NKp46⁺ en intestino, lo cual conduce a un ineficiente control de la infección por *Citrobacter rodentium*. Adicionalmente, se ha observado que la falta de Runx3 en células hematopoyéticas, no afecta el número de CLPs, CHILPs o ILCs, pero se ha relacionado con la expresión de ROR γ t y la subsecuente expresión de AhR (receptor de Aril hidrocarburos) en células ILC3 de intestino. Estos hallazgos sugieren que Runx3 posee un rol no-redundante en la diferenciación de ILC1 e ILC3 ⁴⁷.

Notch: Esta vía de señalización se encuentra altamente conservada entre todos los metazoarios y es crítica en mamíferos para el desarrollo de diversos sistemas. Los mamíferos poseen cuatro receptores Notch transmembranales (Notch 1-4). La señalización mediante Notch tiene un papel fundamental en el desarrollo de linfocitos T, linfocitos B de zona marginal y algunas células dendríticas; sin embargo, su participación en el desarrollo de ILC es ambiguo. En ratón se ha observado que la señalización por Notch participa en las etapas tempranas del desarrollo de ILC, ya que es capaz de regular la expresión de la integrina α 4 β 7 en los progenitores de ILC ⁴⁸, y puede además bloquear la diferenciación hacia linfocitos B, ya que antagoniza la expresión de Ebf1 y Pax5 en los progenitores α 4 β 7⁺ ¹. No obstante, el papel principal de Notch en las ILC, se ha relacionado con la diversificación de poblaciones de ILC2 e ILC3, y a pesar de que el desarrollo de las ILC es timo-independiente, se ha propuesto que los ligandos de Notch extratímicos, presentes en médula ósea, tales como Jagged1, Jagged2, y DLL1 y expresados también por células estromales de hígado fetal (DLL1/4) y por células dendríticas (Jagged 1/2 and DLL1/4) pueden guiar la diferenciación de estas células ¹. Acerca de la participación de la señalización vía Notch dentro de la diferenciación de ILC2 e ILC3, se ha descrito que las señales de Notch promueven el desarrollo de ILC2 tanto *in vitro* como *in vivo* ^{49,50}, sin embargo, también se ha descrito que los precursores de ILC2 (pILC2) pueden diferenciarse a ILC2

maduras aún en ausencia de ligandos de Notch, lo cual sugiere que esta señalización es dispensable en las etapas tardías de maduración y mantenimiento de ILC2³⁰.

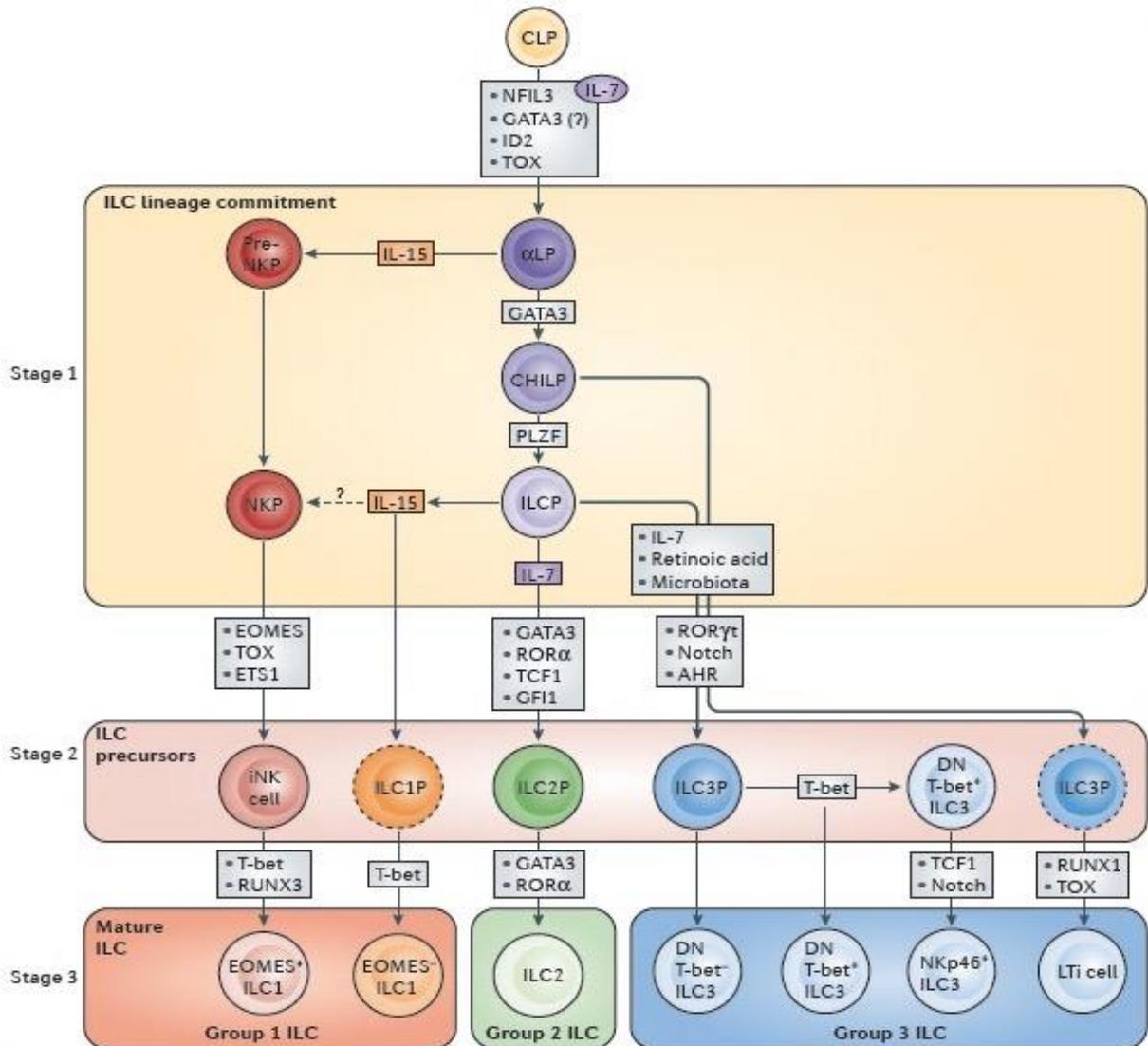
Adicionalmente, se ha observado que Notch también promueve la diferenciación de ILC3. La delección condicional de CBF1 (o Rbpbj: Recombining binding protein suppressor of hairless) en células hematopoyéticas, (utilizada comúnmente para evaluar la señalización por Notch) mostró que en intestino, el número de células ILC3 NCR⁺ y NCR⁻ (NKp46⁺ o Nkp46⁻) se encuentra disminuido en comparación con ratones de tipo silvestre^{51,52}. De manera interesante se ha observado también que el desarrollo de ILC3 NCR⁺ requiere de la señalización mediada por el receptor de Aril Hidrocarburos (AhR) y de T-bet, los cuales a su vez pueden mediar la expresión de Notch2 en ILC maduras⁵²⁻⁵⁴. En resumen, aún no está claro si la señalización por Notch se requiere para la generación y/o mantenimiento de ILC3 o de células precursoras río arriba. Alternativamente, se ha propuesto que Notch puede ser requerido para inducir la expresión de receptores de quimiocinas que controlan la migración de ILC3 NCR⁺ a la lámina propia¹.

La señalización mediada por Notch tendrá que ser ampliamente analizada para esclarecer su papel dentro del desarrollo de las ILC; ya que por una parte parece mediar el compromiso temprano de las mismas, pero también parece controlar la diversificación y compromiso *in situ* de las diferentes subpoblaciones; y además puede estar involucrado en los procesos de plasticidad y mantenimiento en los diferentes tejidos de residencia de estas células.

1.4.3 Etapa 3: Homeostasis de ILC en tejidos.

El mantenimiento de las ILC en tejidos periféricos es importante para optimizar la respuesta contra infecciones y para el remodelamiento tisular después de un proceso inflamatorio o de daño. El proceso de homeostasis de las ILC involucra a los mecanismos necesarios para mantener la diversidad y el número de poblaciones en un nivel óptimo en diversos tejidos; y adicionalmente para cada subpoblación incluye también una combinación de procesos que afectan su generación, circulación, supervivencia, mantenimiento, proliferación y muerte celular. Dentro de los factores que regulan esta etapa, se encuentra la familia de las citocinas dependientes de la cadena gamma común (γc), las cuales se han relacionado con el desarrollo de todas las subpoblaciones de ILC descritas. El papel de cada una se menciona más adelante en la descripción de cada uno de los grupos. Sin embargo, aún no se ha definido qué factores en específico influyen en la supervivencia de estas células en diferentes tejidos (la cual puede ser desde días hasta durante toda la vida del hospedero) o inclusive si hay factores que induzcan la diferenciación hacia un fenotipo de “memoria” en estas células ⁷.

En resumen, las 3 etapas de desarrollo propuestas ⁷, parecen ser una mejor aproximación acerca de las vías requeridas durante el desarrollo de ILC en ratón. En humano, la reciente identificación de una población: Lin⁻, CD7⁺, CD127⁺, CD117⁺ con potencial uni y multiprecursor de ILC apoya la propuesta hecha previamente en ratón y sugiere que la diferenciación de las poblaciones de ILC puede ocurrir en cualquier momento y en cualquier tejido, dependiendo de los requerimientos locales de cada tejido ⁶.



Serafini N. et. al. Nature Rev. Immunol. 15 (2015).

Figura 2. Modelo de las etapas de diferenciación de ILC.

En este modelo se ejemplifican las 3 etapas principales de diferenciación para las ILC. La Etapa 1 considerada como de **“Generación y compromiso de linaje”**, la Etapa 2: **Diversificación de las tres principales subpoblaciones** y la Etapa 3 **“Homeostasis y mantenimiento”**. En cada etapa se resaltan los principales factores de transcripción y señales involucrados en el desarrollo de cada subpoblación. CLP: Progenitor Linfoide Común. ID2: Inhibidor 2 de unión a ADN; NFIL3: Factor Nuclear regulado por IL-3; NKP: Precursor de Células NK; αLP: Progenitor común de ILC; CHILP: precursor de ILC de tipo cooperador; ILCP: Precursor de ILC; iNKP: Célula NK inmadura; ILC1P: Precursor de ILC1; ILC2P: Precursor de ILC2; ILC3P: Precursor de ILC3; DN: Dobles Negativas: CD4⁻ y NCR⁻.

1.5 Localización y función de las subpoblaciones de ILC.

1.5.1 NKs e ILC1:

Las ILC mejor caracterizadas son las células NK, debido a que fueron las primeras en ser identificadas. Estas células se encuentran de manera abundante en sangre periférica en comparación con las ILC de tipo cooperador (alrededor del 15% de los linfocitos totales), y han sido subclasificadas en dos poblaciones principales: CD56^{bright} CD16⁻ y CD56^{dim} CD16⁺, las cuales se diferencian por su fenotipo, función, y localización tisular. La población CD56^{dim} CD16⁺ abarca el 90% de las NK presentes en SP, y gracias a la expresión de CD16 (receptor Fc) una de sus principales funciones es mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). Adicionalmente, gracias a la expresión de receptores de activación, denominados como NCRs (Natural Cytotoxicity Receptors) pueden reconocer diversos ligandos expresados en células tumorales o células infectadas por virus, sobre las cuáles ejercen su función citotóxica, los principales NCRs incluyen a NKp30, NKp44 y NKp46. Las células NK CD56^{dim} expresan además receptores KIRs (Receptores tipo inmunoglobulina), CD94/NKG2A, así como altos niveles de perforina y granzima los cuales median su actividad citotóxica y adicionalmente son capaces de producir citocinas en respuesta a la activación mediada por estos receptores. Por otra parte, la población CD56^{bright} CD16⁻ (KIR⁻ CD94⁺ perforina^{low}) poseen una baja actividad citotóxica y producen una gran cantidad de citocinas en respuesta a otras citocinas tales como IL-12, IL-15 e IL-18; y aunque en sangre periférica representan tan solo el 10%, este fenotipo es el que se encuentra en mayor proporción en órganos linfoides secundarios. Finalmente, las dos subpoblaciones: CD56^{dim} y CD56^{bright} se encuentran distribuidas de manera distinta en tejidos, de acuerdo al patrón de expresión de receptores de quimiocinas de cada una y los factores quimioatrayentes de cada tejido; sin embargo, la población mayormente representada en distintos tejidos es la CD56^{bright} ⁵⁵.

Por otra parte, la identificación general de las ILC1 se ha basado en la expresión del factor de transcripción T-bet y la producción de IFN- γ en respuesta a IL-12, IL-15 e IL-18. El fenotipo general de estas células incluye la expresión de CD127, CD161 y la no expresión de marcadores clásicos de ILC2 e ILC3 (tales como CRTH2 y c-Kit, respectivamente)⁵⁶⁻⁵⁸. Evidencias recientes en humano y ratón, sugieren que esta subpoblación reside preferentemente en tejidos y es prácticamente inexistente en SP⁵⁹. Las ILC1 pueden

distinguirse de las NKs por ser Eomes⁻ y por la falta de actividad citotóxica dependiente de perforina. En ratón se ha propuesto que las NKs e ILC1, se diferencian a partir de dos precursores distintos. Sin embargo, también se ha observado que existe una gran similitud de fenotipos entre estas dos poblaciones. En humano se han identificado células CD127⁺ T-bet⁺ Eomes⁻ IFN- γ ⁺ (CD161⁺, CD56⁻, NKp44⁻, KIR⁻, Perforina⁻) presentes en intestino, las cuales se encuentran en mayor proporción en pacientes con enfermedad de Crohn⁶⁰; casi al mismo tiempo también se describieron a las células ILC1 “intraepiteliales”, una población CD127⁻ presente en el epitelio gastrointestinal y amígdalas, la cual se caracteriza por la expresión de CD56, NKp44, CD103 y adicionalmente Eomes. Posteriormente se identificó a la población de ILC1: CD127⁺, CD161⁺, NKP44⁻ en la piel y se demostró la presencia de células ILC1: CD127⁺ T-bet⁺ Eomes⁻ IFN- γ ⁺ en decidua humana, sin embargo en este tejido las células NK Eomes⁺ representan la mayor proporción de células linfoides⁵⁵. Notablemente, la mayoría de las células NK Eomes⁺ de endometrio y decidua, expresan CD49a, al igual que las ILC1 identificadas en hígado⁶¹; y además pueden expresar CD103 y CD9 (marcadores relacionados con la exposición a TGF- β) y NKp44 de manera similar a lo reportado para las ILC intraepiteliales, por lo tanto se ha planteado que en humano la distinción entre las poblaciones de NKs e ILC1 no es clara.

Uno de los trabajos más recientes en humano, ha incluido el análisis de las diversas subpoblaciones de ILC en tejidos sanos (pulmón, bazo, médula ósea, piel, amígdalas, adenoides, colon, cordón umbilical y sangre periférica) y patológicos (tumor colorectal, tumor pulmonar y omento-tejido adiposo). En dicha investigación, gracias al estudio por citometría de masas (CyTOF) y el análisis de agrupamiento o “clustering” en dos dimensiones (el cual permite analizar la relación entre diversas poblaciones de acuerdo al patrón fenotípico de cada una); se ha logrado identificar a una población denominada como células intraepiteliales tipo ILC1 (ieILC1 like) pero que a diferencia de las ILC1 intraepiteliales identificadas previamente, se encuentran presentes en tejidos sanos no asociados a mucosas. De manera interesante, en tejidos asociados a mucosas (sanos o patológicos) se ha observado una mayor proporción de ILC1, pero el fenotipo encontrado se sobrelapa con el de las células NK, por lo cual se ha cuestionado si estas dos poblaciones consideradas como ILC1 (NK e ILC1 de tipo cooperador) representan en realidad dos subpoblaciones, por lo que en este trabajo se ha

reportado que en los diferentes tejidos analizados no ha sido posible identificar a la población de ILC1. Vale la pena destacar que este estudio hace un análisis exhaustivo de marcadores de superficie, así como de factores de transcripción utilizados normalmente para la identificación de las diversas poblaciones de ILC. Entre las principales aportaciones del trabajo, es la caracterización de una gran diversidad de poblaciones entre individuos y tejidos analizados; debido a esto aún se necesitan más estudios para definir los parámetros más adecuados para la correcta identificación de ILC en humano⁵⁹.

1.5.2 ILC2:

El primer trabajo en donde se identificaron y caracterizaron este subgrupo de ILC en ratón, mostró la presencia de una población definida como Lin⁻ Sca-1⁺ Thy1.1⁺ CD127⁺ T1/ST2(IL-33R)⁺⁶²⁻⁶⁴, la cual era capaz de producir in vivo IL-5 e IL-13 en respuesta a la administración de IL-25 e IL-33, se ha reportado que estas células promueven la protección contra infecciones parasitarias. En un modelo de infección con el parásito *Nippostrongylus brasiliensis*⁶⁴ se ha demostrado que las ILC2 pueden expandirse en la presencia de IL-25 e IL-33 y que son una fuente temprana de IL-13 durante la infección, la deficiencia de IL-25 e IL-33 en este modelo, afectó la expansión de esta subpoblación, lo que trae como consecuencia una deficiente eliminación del parásito. Sin embargo, también se han relacionado con funciones patogénicas en modelos experimentales de asma, enfermedades de pulmón y piel⁶⁵.

En humano, se han identificado ILC2 en intestino fetal y adulto, pulmón, sangre periférica⁶⁶, piel^{67,68}, tejido adiposo⁶⁹ y amígdalas⁶⁰. A pesar de que se ha reportado que la proporción ILC2 se encuentra disminuida en SP de pacientes con infecciones parasitarias, su participación dentro de la respuesta anti-parasitaria en humanos aún no se ha establecido⁷⁰. Adicionalmente se ha observado que esta subpoblación se incrementa en la piel de pacientes con dermatitis atópica y en los pólipos nasales de pacientes con rinosinusitis crónica⁶⁶. Las ILC2 de humano se han caracterizado como CD161⁺, CD127⁺, CD25⁺, ST2⁺ (IL-33R), IL-17RA⁺ y son capaces de producir citocinas tipo Th2: IL-13, IL-5 e IL-4 en respuesta a IL-33 e IL-25. No obstante, también se ha reportado que pueden producir citocinas pro-inflamatorias tales como GM-CSF e IL-8, así como también IL-3, IL-9 e IL-21⁵⁵. Las ILC2 también expresan el receptor de prostaglandina 2 (CRTH2), pero dicha expresión puede ser modulada

dependiendo del tejido de residencia⁷¹. Se ha propuesto que la prostaglandina 2 puede inducir la migración de ILC2 de SP y piel, además de incrementar la producción de citocinas⁷². Todos estos hallazgos han llevado a sugerir que las ILC2 en humano, pueden responder a citocinas producto de células epiteliales, así como también a metabolitos derivados de mastocitos y de esta manera contribuir a la respuesta temprana tipo Th2 mediante la producción de citocinas que promueven el reclutamiento y supervivencia de eosinófilos, así como la polarización Th2. Recientemente también se ha reportado que células ILC2 activadas in vitro expresan NKp30 y que la estimulación mediada por la interacción entre B7-H6 y NKp30 induce también la producción de citocinas tipo Th2 en estas células⁷³. Se ha descrito también, que la expresión de B7-H6 se encuentra ampliamente extendida en las células de piel proveniente de pacientes con dermatitis atópica, lo que sugiere que las ILC2 podrían estar activándose también mediante NKp30⁵⁵.

En cuanto al proceso de diferenciación de las ILC2, se ha descrito en ratón que los factores de transcripción GATA-3³⁰, ROR α ^{50,74}, Notch y TCF-1^{37,49} son necesarios durante este proceso. Por otra parte, en humano se ha descrito que adicionalmente a GATA-3, esta subpoblación también expresa ROR α y niveles bajos de ROR γ t. Un dato interesante, es que en ratón se ha descrito que todas las ILC pueden expresar GATA-3 pero en diferentes niveles; y que este es un factor de transcripción temprano necesario para el desarrollo de todas las subpoblaciones de ILC³³; sin embargo las ILC2 son la población que posee un mayor nivel de expresión del mismo, y es por esto que se ha considerado como un marcador típico de estas células. Adicionalmente se ha propuesto que cualquier célula que posea la expresión de GATA-3 puede dar origen a una ILC2, experimentos realizados con una línea celular generada a partir de células Lin⁻ CD117⁺ CD127⁺ CRTH2⁻ GATA-3⁺ (aisladas a partir de amígdalas humanas) y cultivadas en presencia de TSLP (Linfopoyetina estromal tímica) son capaces de expresar CRTH2 y de producir IL-4, IL-5 e IL-13⁷⁵, esto apoya la idea de que la expresión de GATA-3 es suficiente para la inducción de este fenotipo, sin embargo la presencia de otras subpoblaciones de ILC no fue evaluada en este modelo.

1.5.3 ILC3:

En ratón y humano las ILC3 se han identificado como células $\text{Lin}^- \text{CD127}^+ \text{ROR}\gamma\text{t}^+$ y pueden producir IL-17 e IL-22 en respuesta a estímulos como IL-1 β e IL-23^{76,77}. Además de ROR γt , se ha descrito que otros factores de transcripción como T-bet, TCF-1 y GATA-3 e inclusive el receptor de Aril hidrocarburos (AhR) son requeridos para el desarrollo de estas subpoblaciones^{33,34,52}.

Las ILC3 están conformadas por las poblaciones de células inductoras de tejido linfoide fetal (LTi) y las ILC3 que se desarrollan en la etapa postnatal. En ratón se ha demostrado que las LTi son las primeras en llegar al sitio de desarrollo de nódulos linfáticos (NL), y que pueden inducir la expresión de moléculas de adhesión en células estromales, así como la liberación de quimiocinas que regulan el reclutamiento de linfocitos T, B y células dendríticas que colonizan los NL⁷⁸.

En humano se han identificado células LTi: $\text{Lin}^- \text{CD45}^+ \text{CD127}^+$ presentes en NL mesentéricos fetales y bazo durante el primer y tercer semestre del embarazo^{79,80}. De manera similar a las LTi de ratón, estas células expresan RORC, Linfotoxina (LTA), Linfotoxina (LTB), IL-17, IL-22, CD161, CD7, pero no expresan CD4. Al ser cultivadas con células estromales pueden inducir la expresión de ICAM (Molécula Intercelular de Adhesión-1) y VCAM (Molécula de Adhesión Vascular -1)⁷⁹, lo cual sugiere que *in vivo* pueden mediar la misma actividad inductora de tejido linfoide que se ha observado en ratón. Después del nacimiento, las ILC3 de ratón son necesarias para el desarrollo de las criptoplasmas y de folículos linfoides en el intestino⁵⁴, para el remodelamiento y restauración de los NL después de un proceso infeccioso⁸¹ y en el mantenimiento de la homeostasis del intestino como barrera epitelial, contribuyendo como mecanismo de defensa contra patógenos extracelulares^{82,83}.

Los estudios hechos en humano, a partir de células ILC3 aisladas a partir de amígdalas y estimuladas *in vitro* con IL-23 e IL-1 β ^{84,85} en donde se ha evaluado la producción de IL-22, sugieren que la presencia de ILC3 en el intestino humano pueden conferir las mismas características protectoras. Sin embargo, en otro modelo en ratón, en donde se indujo colitis por *Helicobacter hepaticus*, se ha observado que las ILC3 ($\text{CD90}^+ \text{IL-23R}^+ \text{ROR}\gamma\text{t}^+$) estimuladas *in vitro* con IL-23 fueron capaces de producir IL-17A e IFN γ , y que la frecuencia

de las mismas se encontraba incrementada en el colon de los ratones con colitis, y al utilizar un anticuerpo anti-CD90 para eliminar a las ILC3, los ratones no desarrollaron la colitis⁷⁶, lo cual apunta a que estas células también pueden ser importantes mediadores de procesos inflamatorios. La producción de IL-22, IL-17 e inclusive de IFN γ por parte de las ILC3, sugiere que poseen una dualidad funcional la cual depende de las señales locales y que en algunos casos promueve la regeneración tisular, y en otros la inflamación crónica. Estas observaciones sugieren que las poblaciones analizadas en estos trabajos son muy heterogéneas o que poseen una gran capacidad plástica, la cual se discutirá más adelante.

Las ILC3 en humano se han logrado identificar en distintos órganos; inicialmente fueron descritas en intestino y amígdalas como células Lin⁻ CD56⁺, NKp44⁺, IL-22⁺, por lo cual fueron nombradas como NK22⁸⁶. Posteriormente fueron clasificadas como ILC3, NCR⁺ o NCR⁻ de acuerdo a la expresión de NKp44⁸⁷; sin embargo, se ha observado que existen ILC3 NKp44⁻ que expresan NKp46⁸⁸, por lo que dicha clasificación de NCR⁺ o NCR⁻ debería considerar también a expresión de NKp46. En adulto, las diferentes subpoblaciones de ILC3 difieren en el perfil de citocinas que son capaces de producir. Por ejemplo, las ILC3 NCR⁺ además de IL-22, dependiendo del estímulo, pueden secretar también IL-2, TNF- α , GM-CSF y LIF^{88,89}.

Después del nacimiento, las ILC3 han sido identificadas en distintos órganos que incluyen: bazo, endometrio, decidua, piel y pulmón^{67,90-94}. Las ILC3 de bazo se localizan principalmente en la zona marginal (ZM) y mediante la expresión de BAFF (Factor activador de linfocitos B) y el ligando de CD40, promueven la supervivencia y diferenciación de los linfocitos B de ZM. Adicionalmente, el GM-CSF producido por las ILC3 promueve también la supervivencia y activación de neutrófilos esplénicos, los cuales expresan APRIL (Ligando de inducción de proliferación) el cual promueve la producción de IgA por los linfocitos B de ZM⁹². En decidua humana, se ha demostrado también la presencia de ILC3 NCR⁺ y NCR⁻; y al igual a lo que se ha observado en amígdalas, las dos poblaciones pueden producir IL-17 e IL-22 y TNF respectivamente. De manera interesante se ha descrito que la población de ILC3 CD56⁺ NCR⁺ produce grandes cantidades de IL-8, la cual es requerida durante las etapas tempranas del embarazo; gracias a la producción de esta citocina en conjunto con GM-CSF

se promueve el reclutamiento y supervivencia de neutrófilos⁹⁰. Ambas poblaciones de ILC3 presentes en la decidua promueven la expresión de moléculas de adhesión en células estromales deciduales, lo cual sugiere que juegan un papel importante en el remodelamiento tisular. Por otra parte, la presencia de ILC3 en piel humana, se ha relacionado con patologías inflamatorias tales como la psoriasis^{67,68,91}; en la cual se ha reportado que la frecuencia de ILC3 NKp44⁺ se incrementa en las placas psoriáticas, pero también en la piel no lesionada^{67,91}, la propuesta es que la presencia de IL-8, CCL20, IL-1 β y el péptido antimicrobiano LL37 activan *in situ* a las ILC3. Finalmente, también se han logrado identificar ILC3 asociadas al cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), en donde se ha encontrado una mayor proporción de ILC3 presentes en tejidos tumorales en comparación con los tejidos normales analizados, dicho incremento de esta población correlaciona también con un incremento en el número de estructuras linfoides terciarias presentes en estos pacientes⁹⁴, lo cual sugiere que las ILC3 participan en el control del crecimiento tumoral.

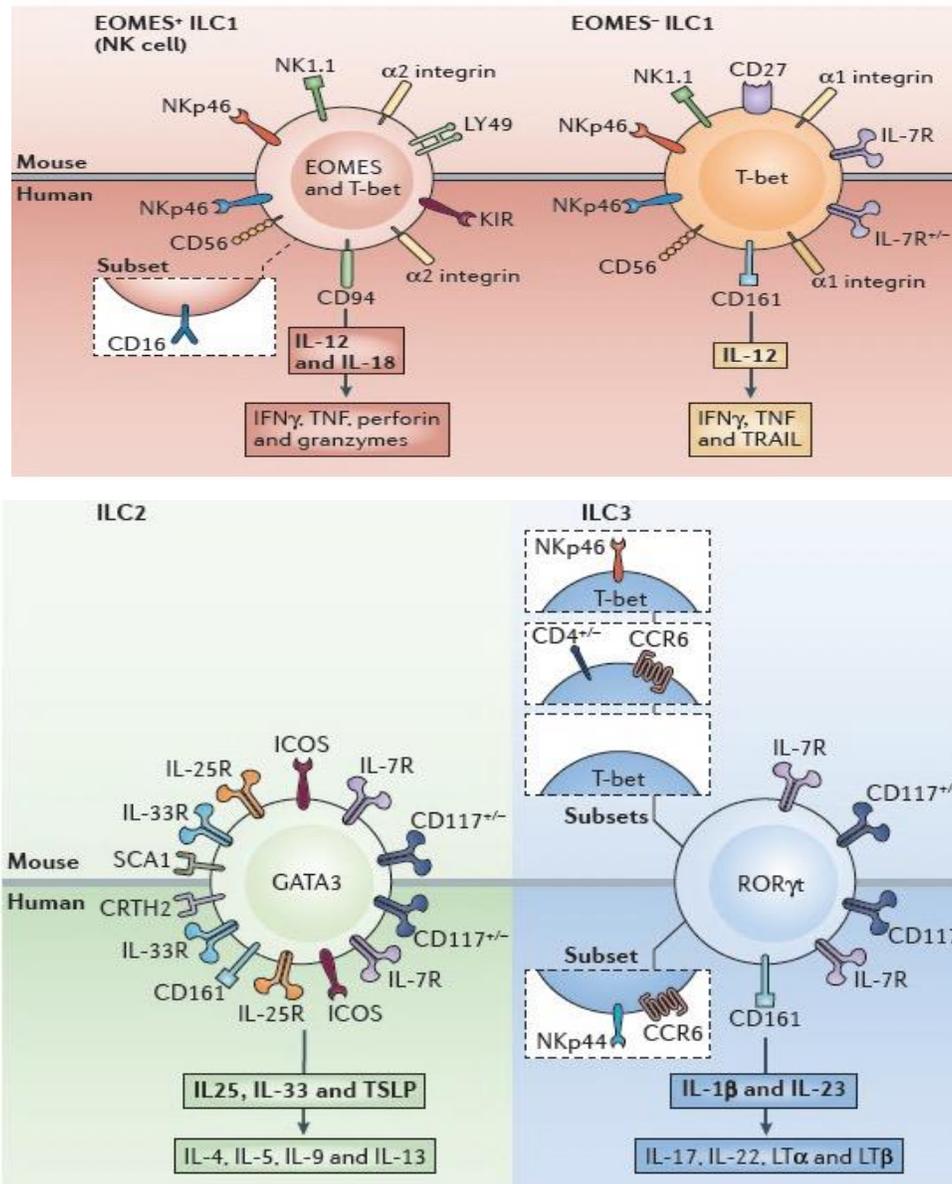
Debido a la gran heterogeneidad o complejidad de subpoblaciones de ILC3, es fácil suponer que su proceso de diferenciación también resulta complejo, dentro de los últimos factores de transcripción involucrados en el desarrollo de ILC3 se encuentra el AhR, el cual es un FT ligando dependiente; sus ligandos han sido clasificados en tres categorías: 1) endógenos: metabolitos del triptófano y fotoproductos, 2) naturales: metabolitos bacterianos, y fitoquímicos provenientes de plantas y 3) toxinas ambientales⁹⁵. La expresión del AhR ha sido reportada en ILC3 (e inclusive en ILC2)⁹⁶.

En ratones deficientes de AhR, se ha demostrado que el desarrollo de órganos linfoides secundarios ocurre de manera normal, y que la frecuencia de LTi, se encuentra inalterada; sin embargo, los ratones adultos carecen de células ILC3 NCR⁺ y NCR⁻ y los órganos linfoides secundarios y criptoplasmas donde normalmente residen presentan un tamaño reducido^{54,97,98}, además de que la producción de IL-22 e IL-17 en estos ratones también se encuentra disminuida, lo que los hace más susceptibles a la infección por *Citrobacter rodentium*. En estos ratones en donde las ILC (AhR^{-/-}) no pueden interactuar con sus ligandos, se ha observado además un incremento en el índice de apoptosis de estas células, lo cual sugiere que el AhR tiene un papel muy importante en la homeostasis de esta subpoblación y que adicionalmente promueve la protección contra infecciones intestinales; esta propuesta ha sido

apoyada por la evidencia que ratones alimentados con una dieta carente de ligandos del AhR durante las primeras semanas de vida, presentaron también una mayor susceptibilidad a infecciones intestinales, debido a la ausencia de ILC3; la administración de un ligando del AhR (3-indol-carbazol) fue suficiente para restablecer la presencia de ILC3 en el intestino y proveer de protección contra infecciones.

Por otra parte, en SP se ha identificado la presencia de diversos ligandos de AhR, los cuales incluyen al resveratrol y al 3-indol-carbinol, los cuales se derivan de vegetales, frutas y semillas⁹⁹ y que posiblemente están involucrados en el mantenimiento de las ILC3 en diversos tejidos. En piel, la función de este FT también ha empezado a ser evaluada, utilizando modelos de psoriasis en ratón y a partir de muestras de pacientes con psoriasis, ha sido posible establecer que el uso de ligandos agonistas del AhR como el FICZ (6-Formilindol (3,2,β) carbazol) es posible disminuir la inflamación local, sin embargo el uso de ligandos antagonistas del AhR como el CH-223191 incrementa la inflamación y a pesar de que los efectos observados han sido atribuidos a la actividad de fibroblastos y queratinocitos¹⁰⁰; la participación de las ILC3 no ha sido evaluada y resulta un campo interesante de estudio para entender mejor el proceso de diferenciación y regulación de las ILC3, así como también para el diseño de nuevas terapias.

La clasificación actual de las ILC de acuerdo a marcadores de superficie, factores de transcripción, así como productos de su activación se resume en la figura 3.



Serafini N. et. al. Nature Rev. Immunol. 15 (2015).

Figura 3. Clasificación de subpoblaciones de ILC.

La caracterización de las diferentes subpoblaciones de ILC en ratón y humano, se ha establecido a partir de la expresión de diversos marcadores de superficie, factores de transcripción y citocinas como se muestra para ILC1, ILC2 e ILC3. En cada subpoblación se indican los principales factores de transcripción que controlan su función y diferenciación, además de los principales marcadores de superficie que sirven para distinguir a cada una de las poblaciones. En **negritas** se indican las principales citocinas descritas para la activación de cada grupo y en la parte inferior las citocinas que se producen en respuesta a dicha activación. CCR: receptor de quimiocinas C-C; CRTH2: Receptor quimioatrayente Th2; GATA-3: Proteína 3 de unión a GATA; EOMES: Eomesodermina; GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; ICOS: Co-estimulador inducible de linfocitos T; IFN: interferón; IL: interleucina; ILR: Receptor de interleucina; KIR: Receptor tipo inmunoglobulina de células asesinas; LT: Linfotoxina; NK ROR γ t: Receptor huérfano gamma-t relacionado al ácido retinoico; TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF; TSLP: Linfopoyetina estromal tímica.

1.5.4 ILC no-convencionales o ILC-like.

Además de las subpoblaciones de ILC “clásicas” ya descritas, en ratón se ha descrito también la existencia de una población “no convencional tipo ILC1” residente de tejido e identificada como TCR⁻, NK1.1⁺, CD49a^{hi}, que a diferencia de las ILC1 clásicas no expresa CD127, posee una baja expresión de Eomes, es capaz de producir Granzima B y no es capaz de producir grandes cantidades de IFN- γ o TNF- α . La identificación de esta población celular fue realizada en un modelo de cáncer de mama de ratón, en donde se observó que el crecimiento tumoral, induce la expansión de células citotóxicas no convencionales, entre ellas esta población denominada como “ILC1 no convencional”, dicha expansión es dependiente de IL-15 y se ha propuesto como un mecanismo adicional de protección que se inicia en respuesta a la transformación de células cancerígenas¹⁰¹. Sin embargo, por las características compartidas con las células NK, es necesario descartar que esta población no pertenezca a dicho linaje. En humano no se ha descrito ninguna población con estas características.

1.6 Plasticidad de ILC.

La plasticidad celular ha sido definida como el proceso por el cual células diferenciadas son capaces de adquirir nuevas características fenotípicas y funcionales, el cual es dependiente de señales del microambiente⁷.

Se ha demostrado que algunas subpoblaciones de ILC tienen la capacidad de adquirir nuevas funciones y fenotipo en respuesta a señales locales del tejido en donde residen, lo cual apoya la idea de que estas células pueden responder rápidamente a diferentes señales para poder ayudar a orquestar la respuesta inmune de manera local. El concepto de plasticidad en ILC, se basa en diversos factores como la expresión compartida de marcadores entre las diferentes subpoblaciones, tales como CD127, CD132, c-kit e inclusive factores de transcripción como GATA-3 o ROR γ t / T-bet; lo cual, en conjunto con el complejo patrón de expresión de factores de transcripción involucrados en su desarrollo (NFIL3, PLZF, TCF-1, etc.) sugiere que las diversas poblaciones de ILC en homeostasis, mantienen el potencial de modificar e inclusive revertir su fenotipo dependiendo de las señales locales.

Para las ILC2 se ha demostrado que expresan el Factor de Crecimiento Independiente-1: (GFI1), el cual controla la expansión de linfocitos Th2 dependiente de IL-2¹⁰² y promueve la polarización Th2 mediante su actividad antagónica de la señal de TGF- β , bloqueando la generación de células Th17 y Treg¹⁰³, por lo cual probablemente también regula la producción de citocinas en ILC2. En ratón se ha demostrado que durante la infección con *Nippostrongylus brasiliensis*, GFI1 regula preferencialmente la respuesta de ILC2 a IL-33 mediante la activación directa de *Il1rl1*, el cual codifica el receptor de IL-33 (ST2)¹⁰⁴.

Hasta el momento hay evidencia de plasticidad para las subpoblaciones de ILC2 e ILC3 pero no de ILC1. Sin embargo, el fenotipo que carece de GFI1, mostró un fenotipo “híbrido” de ILC2, en donde se observó una disminución de GATA-3 y un incremento en la expresión de ROR γ t y la coexpresión de IL-13 e IL-17¹⁰⁴. Otra evidencia en humano, indica que ILC2 aisladas a partir de amígdalas son capaces de producir diferentes citocinas en respuesta a estímulos, en donde ha sido posible identificar al menos dos poblaciones de ILC2: 1) productoras de IL-13 en respuesta a IL-2 y a ligandos del receptor tipo Toll 2 (TLR2)⁸⁵ y 2) productoras de IL-22 en respuesta a IL-2 e IL-23⁶⁶.

En cuanto a la plasticidad de las ILC3, se ha reportado que esta subpoblación posee la capacidad de cambiar su fenotipo para producir IFN- γ y expresar T-bet y ROR γ t. Se ha demostrado que ILC3 estimuladas con IL-23 producen IL-22, pero cuando son cultivadas con IL-12 e IL-18 también pueden producir IFN- γ ⁵⁶. Sin embargo, aún no ha sido posible establecer si esta dualidad funcional requiere forzosamente de la disminución de la expresión de ROR γ t¹⁰⁵.

Adicionalmente, en humano, se ha descrito que la población presente en amígdalas e identificada como Lin⁻ c-Kit⁻, NKp44⁻, ROR γ t⁺, posee características de ILC1 (presencia de transcritos de IFN- γ) y que carece de marcadores clásicos de NKs como CD56 y CD94, esta población ha sido encontrada también en intestino, y se ha observado que la frecuencia de estas células se encuentra incrementada en pacientes con enfermedad de Crohn⁶⁰. Otra evidencia que apoya la plasticidad de estas células, es que las células ROR γ t⁺, c-Kit⁺, NKp44⁻, identificadas a en amígdalas e hígado fetal, al ser cultivadas durante 8 días con IL-2, IL-1 β e IL-23 o IL-2 más IL-12 presentaron un fenotipo de ILC3 e ILC1 respectivamente, lo cual sugiere que las células

ILC3 son capaces de modificar su fenotipo y producir IFN- γ , además de disminuir la expresión de c-Kit y de mantener la expresión de ROR γ t⁶⁰. Finalmente, también se ha mostrado que las ILC3 (sin incluir a las LTi) requieren de T-bet durante su desarrollo⁵², lo cual indica que bajo ciertas condiciones, esta población puede redirigir su fenotipo hacia el de ILC1. En intestino, se ha propuesto que la expresión de ROR γ t en ILC3 es estabilizada por IL-7 y señales proporcionadas por la microbiota, y que la activación mediada por IL-15 puede promover la desregulación de la expresión de ROR γ t, así como promover la expresión de T-bet e IFN- γ . Se ha propuesto también que este proceso de plasticidad ILC3-ILC1 es crucial durante la respuesta contra *Salmonella* entérica^{7,58}, lo cual apoya la idea de que las ILC tienen la capacidad de cambiar fenotípica y funcionalmente en respuesta a los requerimientos locales.

Las implicaciones de estos cambios fenotípicos y funcionales durante la progresión de diferentes procesos inflamatorios e infecciosos, así como los cambios epigenéticos que se llevan a cabo durante este proceso, son actualmente un campo activo de investigación⁷.

Finalmente, los últimos estudios realizados han propuesto que las ILC tienen una función adicional como reguladoras de la respuesta inmune. Se ha observado que las ILC3 pueden expresar MHCII mediante el cual interactúan con linfocitos T CD4⁺. En intestino se ha determinado que estas ILC3 ayudan a regular la inflamación crónica al controlar la activación de linfocitos T CD4 antígeno específicos de la microbiota. No obstante, dicha regulación por parte de las ILC3 parece ser dependiente del tejido de residencia, el tipo de activación e inclusive de la presencia de algún proceso patológico; ya que también se ha observado que este mecanismo de regulación entre las ILC3 y linfocitos T CD4⁺ es diferente entre células provenientes de intestino y de bazo, las cuales están expuestas a diferentes microambientes¹⁰⁶. Es importante mencionar que el estudio de los mecanismos de regulación de las ILC, es actualmente un campo activo de investigación en donde se busca establecer nuevas terapias mediante las cuales se busca inducir o inhibir la actividad de estas células dependiendo del tejido de residencia.

1.7 Papel de las ILC en la respuesta inmune en el humano.

De manera interesante, a pesar de que existen evidencias de la presencia de poblaciones celulares que comparten algunas características a nivel transcriptómico, morfológico y fenotípico con las ILC en vertebrados como la lamprea; en realidad, hasta el momento solo en mamíferos, más específicamente en ratón y humano, ha sido descrita la gran diversidad de poblaciones de ILC de tipo cooperador. Sin embargo, es necesario resaltar que la presencia de células NKs ha sido documentada en diferentes especies y se ha propuesto también que el desarrollo de órganos linfoides secundarios en diversas especies pudiera asociarse a la presencia de células LTi; lo anterior sugiere, desde un punto de vista evolutivo, que el desarrollo de las ILC en organismos más evolucionados (como los mamíferos) pueden conferir a la respuesta inmune de mejores mecanismos efectores de protección ¹⁰⁷.

No obstante, que en ratón existen diversos modelos en donde se ha demostrado la importancia de las diferentes subpoblaciones de ILC dentro de la respuesta inmune; recientemente en humano, se ha propuesto que la función de estas células en presencia de células de la inmunidad adaptativa (linfocitos T) es redundante ¹⁰⁸. En dicho estudio, se ha realizado el seguimiento de un grupo de 18 pacientes con inmunodeficiencia combinada grave (SCID), los cuales presentaron una mutación en el gen que codifica para IL2RG (cadena gamma común del receptor de IL-2) o la cinasa JAK3 y que por lo tanto presentan una deficiencia de linfocitos T, así como de todas las subpoblaciones de ILC; mientras que los linfocitos B se encuentran presentes en proporciones normales.

Los pacientes con SCID, son sometidos normalmente a un trasplante con CTH (comúnmente, sin llevar a cabo un tratamiento mieloablativo total previo). El seguimiento de los pacientes de este estudio se realizó durante un periodo de 7-39 años después de recibir el trasplante; en estos individuos se observó una reconstitución total de linfocitos T, pero no así de las diferentes subpoblaciones de ILC (en SP y tejidos analizados), con excepción de un par de pacientes en donde se observó la reconstitución únicamente de ILC1.

De acuerdo a los resultados previos obtenidos en ratón, se había planteado que la diferencia en la falla de la reconstitución de las ILC, es el tratamiento mieloablativo previo al trasplante; sin

embargo, en este estudio únicamente fue posible analizar a un paciente con SCID con el cual se siguió este esquema; a pesar de esto, en este individuo no se observó la reconstitución de ILC en SP. No obstante, algunos de los pacientes con SCID (los cuales recibieron un tratamiento mieloablativo parcial) mostraron una ligera recuperación de ILC en los tejidos analizados. Notablemente, la deficiencia de ILC en estos pacientes durante el tiempo de seguimiento, no se relacionó con una mayor susceptibilidad de presentar algún tipo de enfermedad en particular; por lo cual una de las principales conclusiones de este trabajo es que la presencia de ILC en condiciones normales, es decir en presencia de células de la inmunidad adaptativa, no es crucial para mantener los mecanismos de defensa ¹⁰⁸.

A pesar de que el estudio hecho con pacientes con SCID, sugiere una función redundante de las ILC, es necesario mencionar que existen otros trabajos hechos en humano en donde se ha propuesto una dualidad funcional de estas células, ya que pueden participar en procesos patogénicos o bien como parte de los mecanismos de regeneración tisular, los hallazgos más importantes de los mismos se resumen a continuación.

Uno de estos trabajos ha evaluado a un grupo de 55 pacientes con inmunodeficiencia común variable (CVID), en donde a pesar de que el tratamiento con inmunoglobulinas ayuda a reducir el número de infecciones; comúnmente se presentan complicaciones inflamatorias y de carácter autoinmune. En este trabajo se encontró que en los pacientes con CVID que presentaron dichas complicaciones, existía una mayor frecuencia (en SP y tejidos analizados) de una población de ILC identificada como: Lin⁻, CD127⁺, CD161⁺, T-bet⁺, RORγt⁺, capaz de producir IFN-γ, IL-17 e IL-22; este fenotipo se ha denominado como ILC3 de tipo pro-inflamatorio. En estos pacientes el aumento en la producción de IFN-γ es considerado como una característica recurrente; y se ha propuesto que dicho incremento está asociado con la expansión de las ILC3, las cuales estarían contribuyendo al desarrollo de enfermedades inflamatorias en estos individuos ¹⁰⁹.

Por otra parte, un estudio longitudinal realizado con 51 pacientes con leucemia aguda, evaluó los efectos del uso de quimioterapia, radioterapia y el trasplante alogénico de CTH sobre la composición, fenotipo y recuperación de las ILC en SP. En este estudio se encontró que los tratamientos de quimioterapia y radioterapia inducen la pérdida de las ILC en circulación, y que la recuperación de las mismas después de realizarse el trasplante con CTH, es muy lento en

comparación con los monocitos y neutrófilos. Interesantemente se reportó que después de los tratamientos (antes y después del trasplante), existe en circulación un incremento de células ILC3 NCR⁺; esta población además expresa CD69 (marcador de activación), Ki-67 (indicador de proliferación); y moléculas asociadas con la migración a intestino (α 4 β 7, CCR6) y piel (CCR10 y CLA); la presencia de estas células en SP de los individuos que recibieron el trasplante de CTH, correlacionó con una menor incidencia de presentar enfermedad injerto contra huésped (EICH). En conjunto estos datos sugieren que las ILC pueden tener un papel protector, posiblemente mediante la producción de IL-22, la cual ayuda a la regeneración tisular inducida por los tratamientos, lo cual se ha asociado con un menor riesgo de desarrollar la EICH en estos individuos ¹¹⁰.

En resumen, se ha propuesto que las ILC tienen funciones redundantes y no redundantes con los linfocitos T, las cuales pueden ser benéficas o perjudiciales. Por una parte, las ILC en conjunto con los linfocitos T, pueden ayudar a mantener una respuesta inmune robusta, pero también pueden controlar el riesgo de inmunopatologías, ya que la aparente división de funciones entre células que comparten funciones complementarias o similares, pueden limitar la activación de subpoblaciones de linfocitos, reduciendo de esta manera la activación excesiva de las mismas lo cual pudiera ser un mecanismo de control de los procesos autoinmunes ¹¹¹.

Es importante resaltar que en humano se ha reportado que la frecuencia de las ILC es mayor en tejidos fetales y cordón umbilical en comparación con lo reportado en adultos¹⁰⁸; estos resultados sugieren que la función de las ILC es particularmente importante cuando el sistema inmune adaptativo no se ha desarrollado por completo o cuando por alguna razón no funciona adecuadamente durante la vida adulta¹⁰⁷. En contexto con esta propuesta, se ha observado que durante la infección aguda con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, existe una disminución de ILC en SP de estos individuos, y que posiblemente esta disminución contribuye a la alteración de la respuesta inmune en estos pacientes, en donde el número de linfocitos T CD4⁺ se encuentra también disminuido ¹¹².

1.8 IL-7 durante el desarrollo de las ILC.

En general, las subpoblaciones de ILC expresan la cadena alfa del receptor de IL-7 (IL-7R α , CD127) ⁶², este receptor está compuesto por una cadena gamma común (γ_c , CD132) y una cadena alfa. La cadena alfa de este receptor es utilizada también por la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), mientras que la cadena gamma es un componente compartido de los receptores de las citocinas: IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21. Se ha descrito que la señalización de la IL-7 (al igual que para la mayoría de células linfoides), es importante durante las etapas tempranas de diferenciación y mantenimiento de ILC, lo cual incluye al CLP ¹¹³. Se ha descrito también que en ausencia de IL-7, la frecuencia de prácticamente todas las poblaciones de ILC se ve reducida, con excepción de las células NK, las cuales a pesar de que pueden llegar a expresar CD127, no dependen de la señalización de IL-7 para su desarrollo ¹¹⁴⁻¹¹⁷.

No obstante, que la IL-7 es una citocina clave en el desarrollo de células linfoides, el mecanismo por el cual regula la diferenciación de progenitores de ILC y las diferentes subpoblaciones aún no está del todo claro ¹¹⁸. Hasta el momento se ha propuesto que la IL-7 induce a STAT5 la cual a su vez induce y mantiene la expresión de NFIL3, el cual posteriormente regula la expresión de ID2 en los denominados CHILPs ¹¹⁹. Sin embargo, es importante señalar que a diferencia de ID2, se ha observado que la eliminación de NFIL3 no conlleva a una pérdida total de ILC, por lo cual el mecanismo de interacción y regulación de estos y otros factores clave como TCF-1 durante el desarrollo de las ILC aún se encuentra en estudio ³.

Adicionalmente, las dos poblaciones de ILC en donde se sabe un poco más acerca de la función de la IL-7, son las células LT_i y las ILC3⁹⁵. En las células LT_i, se ha propuesto que la IL-7 regula la expresión de linfotoxina A y B (LTA y LTB), las cuáles son necesarias para la posterior inducción de moléculas de adhesión (ICAM, VCAM y quimiocinas) en células mesenquimales de estroma¹²⁰; por lo tanto la falta de LTA y LTB en células LT_i tiene como consecuencia una deficiente formación de Placas de Peyer; sin embargo la formación de nódulos linfáticos solo se ve afectada parcialmente¹²¹.

Por otra parte, en intestino se han propuesto mecanismos adicionales de regulación de IL-7 y su receptor durante la etapa adulta. Se ha observado que señales provistas por la microbiota pueden

inducir la producción de IL-7 por parte de las células epiteliales, y que el aumento de esta citocina, estabiliza la expresión de ROR γ t en ILC3, con el objetivo de promover la producción de IL-22; en ausencia de microbiota se ha observado que las ILC3 al disminuir la expresión de ROR γ t son capaces de revertir su fenotipo y producir IFN- γ . Otro mecanismo propuesto es la regulación de la expresión de CD127 mediada por el AhR, este mecanismo se basa en las observaciones realizadas en ratones AhR^{-/-}, en donde se ha determinado que el desarrollo de ILC3 ROR γ t⁺ se ve afectado principalmente en ratones adultos ⁹⁵. En conjunto estos mecanismos de modulación de la IL-7 y su receptor son blancos terapéuticos potenciales, mediante los cuales probablemente se puede controlar la respuesta inmune de manera local.

A pesar de estas evidencias, aún no se sabe exactamente cuáles son los mecanismos mediante los cuales la IL-7 mantiene la supervivencia y diferenciación de las ILC, sobre todo en etapas tardías de diferenciación, así como también cuál es la principal fuente de esta citocina en los diferentes tejidos donde residen estas células. Finalmente, es necesario mencionar que aunque la IL-7 es la citocina normalmente relacionada con la diferenciación de células linfoides (incluyendo a las ILC), la función de otras citocinas en este proceso aún se encuentra muy poco explorado, tal es el caso del reciente reporte en humano, en donde se ha descrito que la diferenciación del precursor de ILC identificado en SP y tejidos requiere adicionalmente de IL-2 e IL-1 β en los modelos utilizados ⁶.

1.9 IL-3 y la regulación de NFIL3.

La IL-3 es un factor de crecimiento, el cual estimula la proliferación de CTH e incrementa la actividad de células efectoras maduras^{122,123}. Su expresión ha sido reportada en linfocitos T activados, células NK y mastocitos¹²³⁻¹²⁵. Se ha descrito que esta citocina es capaz de ejercer su actividad sobre una gran diversidad de células blanco, desde células progenitoras, hasta células maduras ¹²⁶. De manera clásica la actividad de la IL-3 se ha relacionado con la generación, maduración y diferenciación de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, basófilos, megacariocitos y células eritroides^{126,127}, pero también se ha descrito que puede inducir la diferenciación de células dendríticas en presencia de TNF- α a partir de células CD34⁺ ¹²⁸ y se sabe también que regula la diferenciación de células dendríticas plasmacitoides¹²⁹.

Esta citocina al igual que otros factores de crecimiento, es capaz de prevenir la muerte celular por apoptosis y de promover *in vitro* la supervivencia de distintas estirpes celulares¹³⁰. Se ha propuesto que la regulación de la apoptosis mediada por IL-3 (y otros factores de crecimiento) es un mecanismo que permite controlar la proliferación masiva de células del sistema hematopoyético, la cual ocurre bajo condiciones de “emergencia” como infecciones o procesos inflamatorios¹²⁷. Al igual que otras citocinas, se ha demostrado que la IL-3 posee actividad sinérgica con otros factores de crecimiento, como por ejemplo: con C-CSF-1 para la diferenciación de macrófagos, con G-CSF para la diferenciación de neutrófilos y con IL-11 para la diferenciación de megacariocitos; en ratón y humano se ha observado que la IL-3 actúa de manera sinérgica con CSF-1, SCF (Stem Cell Factor) e IL-1 estimulando el crecimiento de CTH¹²⁶. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado si existe algún tipo de sinergismo en la actividad de IL-3 e IL-7 en la diferenciación de ILC.

El papel de la IL-3 en la diferenciación de linfocitos T y B, hasta el momento ha sido controversial, ya que se ha reportado que CTH capaces de dar origen tanto a linfocitos T y B son afectadas de manera directa e indirecta por la actividad de IL-3¹²⁶. Por otra parte, se ha demostrado que la administración de IL-3 a ratones con deficiencias funcionales en la cinasa JAK3 (los cuales presentan diversos defectos en el proceso de linfopoyesis), promueve la producción de timocitos y linfocitos T, la cual se propone es capaz de sustituir la actividad de la IL-7 sobre precursores linfoides¹³¹. Por otra parte, se ha reportado que la función de la IL-3 en algunos casos es capaz de promover la diferenciación de líneas celulares hacia linfocitos B¹³²; sin embargo, también se ha reportado que la IL-3 puede actuar sobre precursores hematopoyéticos tempranos CD34⁺, bloqueando la diferenciación de linfocitos B¹³³.

La IL-3 ejerce su actividad biológica mediante la unión a su receptor expresado en la superficie de las células. Dicho receptor está conformado por dos subunidades: 1) la cadena alfa (CD123) la cual se une con baja afinidad a la IL-3, y 2) la cadena beta (CD131), la cual no se une por sí sola a la IL-3, pero que al ser co-expresada con la cadena alfa le confiere gran afinidad por dicha citocina. Comúnmente se ha asociado la expresión de CD123 con células del linaje mieloide como mastocitos o basófilos, por lo cual por muchos años se ha utilizado IL-3 (en modelos *in vitro* e *in vivo*) como un factor de crecimiento clave en la diferenciación y activación de estas

estirpes celulares¹²⁷. Normalmente, los basófilos (en humano y ratón) mantienen una elevada expresión de CD123 durante toda su vida, lo cual se ha asociado con el requerimiento de IL-3 para la activación de estas células; sin embargo, han sido descritos factores de crecimiento adicionales como TSLP, la cual puede inducir la diferenciación y activación de basófilos, aún en ausencia de IL-3¹³⁴. Interesantemente, los basófilos comparten la alta expresión de CD123 con las pDCs, las cuales se considera que en su mayoría se originan a partir de precursores linfoides; sin embargo, aún no se ha podido explicar si el desarrollo de ambas estirpes guarda alguna relación¹²⁷.

Otra función importante de la IL-3 es la inducción de la expresión de NFIL3¹³⁵, el cual se ha establecido como un factor de transcripción maestro durante el proceso de diferenciación de ILC. Interesantemente, el papel de NFIL3 durante el desarrollo de otras estirpes celulares como células dendríticas CD8 α ⁺¹⁷ e inclusive células NKs¹³⁶ ha sido reportado, sin embargo en ninguno de estos casos se ha evaluado la actividad de la IL-3 sobre la regulación de NFIL3. Las únicas células en donde se ha determinado que la IL-3 posee una actividad reguladora sobre NFIL3, son las líneas celulares de pro-linfocitos B (Baf-3 y FL5.12), en la cuales se ha propuesto que el incremento de la actividad de este factor se da mediante la vía de las MAP cinasas (Mitogen-Activated Protein) y la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)¹³⁷. En estas células también se ha establecido que NFIL3 actúa de manera simultánea con Bcl-XL para inhibir la apoptosis, en respuesta a IL-3¹³⁷⁻¹³⁹. Adicionalmente, utilizando estas mismas líneas celulares se ha propuesto también, que los factores GATA-1 y GATA-2 juegan un papel importante en la activación transcripcional de NFIL3 inducida por IL-3¹³⁵.

A pesar de que se ha descrito que NFIL3 es un factor clave en el desarrollo de ILC, y que se ha establecido que la IL-3 puede mediar su actividad en otras células; el papel de la IL-3 sobre la diferenciación de ILC no ha sido evaluado, debido a que normalmente la identificación de estas células en diversos tejidos se hace excluyendo a las células que expresan el receptor de IL-3 (CD123), con el objetivo principal de eliminar basófilos y pDCs del análisis. Se ha establecido que tanto la IL-3 como NFIL3 son importantes en diferentes procesos de activación y diferenciación celular tanto de linaje mieloide como linfoide, por lo cual probablemente también estén implicados en el desarrollo de ILC.

2. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años se ha demostrado la importancia de las ILC como efectoras de la respuesta inmune innata y como mediadoras de la respuesta adaptativa. Recientemente en humano se ha establecido que existe una gran diversidad de poblaciones de ILC con múltiples funciones, cuya importancia ha sido establecida en diversos modelos. De acuerdo a la variedad de poblaciones observada, resulta importante evaluar la presencia de nuevas poblaciones que comparten características funcionales, así como establecer cuáles son los factores que guían su diferenciación y activación.

Se ha descrito que tanto la IL-3 como NFIL3 poseen actividad sobre un gran número de células del sistema inmune. Por una parte, se ha establecido que NFIL3 en respuesta a IL-7 es un factor clave en el desarrollo de ILC; sin embargo, en otras estirpes celulares se ha establecido que la actividad de NFIL3 es regulada también por la IL-3.

En ILC, la actividad de la IL-3 en dicha regulación no ha sido evaluada, ya que generalmente la identificación de estas células se basa en la expresión de CD127 (IL-7R α) y no en la de CD123 (IL-3R α). De acuerdo a esto, se desconoce si existen células Lin⁻ CD123⁺ presentes en diversos tejidos que posean características fenotípicas de ILC, incluyendo la expresión de NFIL3 y cuál es la actividad de la IL-3 sobre ellas.

3. HIPÓTESIS

En SP y piel de individuos sanos existen células Lin⁻ CD123⁺ con características fenotípicas y funcionales de ILC.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las características fenotípicas y funcionales de ILC en células Lin⁻ CD123⁺ de SP y piel de individuos sanos.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar células Lin⁻ CD123⁺ en sangre periférica de individuos sanos.
- Evaluar las características morfológicas y fenotípicas de ILC en células Lin⁻ CD123⁺ presentes en sangre periférica.
- Determinar en células Lin⁻ CD123⁺ el efecto de IL-3 en la expresión de factores de transcripción característicos de ILC.
- Evaluar las características funcionales de ILC en las células Lin⁻ CD123⁺ de sangre periférica.
- Evaluar en células Lin⁻ CD123⁺ la expresión de marcadores que participan en la redistribución de sangre periférica a tejidos periféricos.
- Identificar células Lin⁻ CD123⁺ en piel de individuos sanos.
- Evaluar las características fenotípicas y funcionales de ILC en células Lin⁻ CD123⁺ presentes en piel.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP).

Las células fueron colectadas a partir de concentrados leucocitarios de donadores sanos provenientes del Banco de Sangre del “Hospital Infantil de México: Federico Gómez” y del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI. La sangre se diluyó en proporción 1:1 con buffer salino de fosfatos (PBS) para posteriormente separar las CMSP mediante un gradiente de densidad utilizando Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Noruega), las muestras se centrifugaron por 25 min a 2000 rpm, finalizado este tiempo se colectaron las células, se realizaron tres lavados con PBS: se centrifugaron por 10 minutos dos veces a 1500 rpm y una vez a 700 rpm (eliminación de plaquetas); finalmente se determinó el número total de células mediante conteo en cámara de Neubauer utilizando azul tripano como colorante vital.

5.2 Obtención de células de piel.

Las muestras de piel fueron obtenidas del remanente de cirugías plásticas o abdominales libres de patologías dermatológicas provenientes del “Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepulveda CMN Siglo XXI”. Las muestras de piel fueron mecánicamente limpiadas de grasa y cortadas para posteriormente incubarse toda la noche en medio RPMI suplementado (10% Suero Fetal Bovino) y dispasa II (Proteasa Grado II, Roche, Suiza). Terminada esta incubación se separó mecánicamente la dermis de la epidermis. Las muestras de dermis se dejaron en cultivo con RPMI suplementado por 7 días (5% CO₂/37°C) para permitir la migración de las células desde los segmentos de piel hacia el medio de cultivo, finalizado este tiempo se cosecharon las células, y se determinó el número total de células mediante conteo en cámara de Neubauer utilizando azul tripano como colorante vital.

5.3 Citometría de flujo:

- Tinciones de superficie: Las tinciones de inmunofluorescencia se realizaron a partir de las CMSP o células de piel obtenidas; las cuales se incubaron por 15 min/4°C con un buffer casero (FACS buffer) que contiene 2% de suero de caballo, con el objetivo de

bloquear los receptores Fc previo a la realización de la tinción. Posteriormente las células se tiñeron con diferentes cocteles de anticuerpos acoplados a distintos fluorocromos (lista completa en Anexo 4) durante 20 min/4°C. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min/4°C. Todos los anticuerpos utilizados fueron comparados con el control de isotipo-fluorocromo correspondiente.

- Tinciones intracelulares: Después de realizar la tinción de superficie, para la evaluación de factores transcripcionales y citocinas se realizó la fijación y permeabilización de las células utilizando el buffer “Fixation and Permeabilization buffer Set” (Biolegend, San Diego, California) para los factores transcripcionales o el buffer Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose California) para las citocinas de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes. Posteriormente las células se incubaron con los anticuerpos correspondientes (lista completa en Anexo 4) durante 30 min a temperatura ambiente.

Las muestras fueron adquiridas utilizando el citómetro de flujo FACS Canto (BD Biosciences, San Jose California) y fueron analizadas utilizando el programa Flowjo (Treestar).

- Enriquecimiento por perlas magnéticas (MACS:Magnetic Associated Cell Sorting): Para aislar las diferentes poblaciones celulares, se partió de CMSP obtenidas a partir de un gradiente de densidad, las cuales fueron incubadas con un cóctel de anticuerpos (anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD94 y anti-HLA-DR) acoplados todos a ficoeritrina (PE) durante 20 min/4°C. Posteriormente las células se lavaron dos veces con buffer MACS (PBS, 0.5% ASB, 2mM EDTA, pH 7.2), y se incubaron con perlas magnéticas anti-PE (Miltenyi-Biotec, BG, Alemania) por 15 min a 4°C, finalizado este tiempo se realizaron dos lavados con buffer MACS. Finalmente, la eliminación de la mayoría de células “linaje positivas” se realizó utilizando una columna LD (Miltenyi-Biotec, BG, Alemania). Nuevamente se contaron las células en cámara de Neubauer y se procedió a realizar la tinción de inmunofluorescencia para identificar a la población de interés en el citómetro de flujo.

- Separación celular por citometría de flujo (cell sorting): Posterior al enriquecimiento realizado mediante MACS, las células se tiñeron con los anticuerpos anti-CD123 y anti-CD127 y fueron separadas mediante citometría de flujo utilizando un FACS Aria II (BD Biosciences, San Jose California). Los criterios de elección de la población de interés fueron: 1. Elección de eventos individuales (FSC-H vs. FSC-A), 2. De acuerdo a tamaño y granularidad (FSC vs SSC) se seleccionó la región linfoide, 3. Células linaje negativas y 4. Expresión diferencial de los marcadores CD123 y CD127; de este modo se separaron las poblaciones de interés: Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺.
- Heat maps: Se determinaron las medianas de las intensidades de fluorescencia para cada marcador de superficie en cada población analizada, a partir de las cuales se crearon los “heat maps”, los cuales de acuerdo a una escala de color muestran la mínima y máxima expresión determinada por citometría de flujo. El valor mínimo reportado (gris) corresponde al control de isotipo, y el valor máximo reportado (rojo) corresponde a la población celular con el valor más alto de mediana de fluorescencia.
- Citometría de flujo con imágenes (Imaging Flow cytometry). La morfología de las células Lin⁻ CD123⁺ aisladas previamente por citometría de flujo, se tiñeron con el colorante nuclear DAPI (Thermo-Fisher-Scientific, Massachusetts, USA) y fijadas con 4% durante 20 min/4°C, las muestras fueron adquiridas utilizando citómetro de flujo con imágenes “Amnis ImageStream Mark II) y analizadas utilizando el programa IDEAS ® (Merck-Millipore, Massachusetts, USA).

5.4 RT-PCR Cuantitativo.

El ARN total se extrajo a partir de células aisladas por citometría de flujo de tres diferentes donadores, para lo cual se utilizó el kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) y el ADNc se sintetizó utilizando el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo-Fisher-Scientific, Massachusetts, USA) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. La expresión cuantitativa del IL7R α y GAPDH se determinó utilizando el Maxima Syber Green qPCR Master Mix (Thermo-Fisher-Scientific, Massachusetts, USA) y el Rotorgene Real Time PCR System

(Qiagen, Hilden, Germany). Los primers utilizados fueron: IL7R α -Forward: 5' AGG ATG AAA ACA AAT GGA CGC A 3'. IL7R α -Reverse: 5' CCT TTA AAA TAG TGA TCA GGG ATG G 3'. El tamaño del producto de ADNc fue de 128 bp.

5.5 Ensayos de activación celular.

Las CMSP fueron estimuladas utilizando el “*cell stimulation cocktail*” (PMA/Ionomicina) y el “*protein inhibitor cocktail*” (Brefeldina/Monensina) (eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, California) durante las últimas 6 horas de cultivo para posteriormente evaluar la producción de citocinas intracelulares. En algunos experimentos (indicados en las figuras correspondientes) se añadió IL-3 e IL-7 (PeproTech New Jersey, USA) durante 18 horas para evaluar el fenotipo y expresión de factores transcripcionales. Adicionalmente también se evaluó la producción de citocinas intracelulares en respuesta a los diferentes coctéles de activación (ILC1: IL-12 e IL-15, ILC2: IL-2 e IL-33 e ILC3:IL-2, IL-1 β e IL-23) (PeproTech New Jersey, USA) en los cuales se incluyó también IL-3 e IL-7. Las concentraciones utilizadas se encuentran descritas en el Anexo 5 (Tabla2).

5.6 Ensayo de entrecruzamiento con IgE.

Las CMSP se incubaron con IgE humana (1 μ g/mL) (Merck-Millipore, Massachusetts, USA) durante 2 horas, posteriormente se lavaron dos veces con RPMI suplementado y se incubaron por 30 minutos más con el anticuerpo anti-IgE humana (2mg/mL) (BD Biosciences, San Jose California), finalizado este tiempo se lavaron nuevamente y se determinó la activación de estas células de acuerdo al cambio en la expresión de marcadores fenotípicos.

5.7 Inmunofluorescencia y microscopía confocal.

A partir de células aisladas por citometría de flujo (Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺) se realizaron las tinciones de inmunofluorescencia utilizando los siguientes anticuerpos primarios: cabra-anti-ID2 (R&D Systems, Minneapolis, USA) e IgG de cabra (control de isotipo) (Caltag Laboratories, California, EU) la incubación se realizó a 4°C en cámara húmeda, durante toda la noche, posteriormente se realizaron los lavados y se añadió el anticuerpo secundario: anti-IgG de cabra-biotina a 4°C durante 2 horas en cámara húmeda, nuevamente se realizaron los lavados y finalmente se incubó con la estreptavidina AlexaFluor 488(Jackson-ImmunoResearch, West

Grove, California) a 4°C durante 2 horas, después de los lavados se añadió Vectashield-DAPI (Vector-laboratories, Burlingame, California), se colocaron los cubreobjetos y se sellaron las laminillas para su posterior adquisición. Las imágenes fueron adquiridas utilizando el microscopio confocal: Leica TCS SP8x (Leica, Wetzlar, Alemania) y se analizaron con el programa del microscopio.

5.8 Ensayos de viabilidad celular: Células aisladas por citometría de flujo (Lin⁻ CD123⁺) se cultivaron en presencia o ausencia de IL-3 (PeproTech New Jersey, EU) durante 3 días a 37°C/ 5% CO₂. Terminado este tiempo las células se cosecharon y se tiñeron utilizando el Kit: FITC Annexin V Apoptosis Detection (BD Biosciences, San Jose California) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se adquirieron en el citómetro FACS Canto (BD Biosciences, San Jose California) y analizadas con el programa Flowjo (Treestar), para determinar la viabilidad de cada muestra.

5.9 Cuantificación de citocinas en sobrenadantes: Células Lin⁻ CD123⁺ o Lin⁻ CD127⁺ se cultivaron en presencia o ausencia de IL-3 (PeproTech, New Jersey, USA) durante 18 horas (37°C/ 5% CO₂), y en presencia o ausencia del *cell stimulation cocktail* (eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, California) durante las últimas 6 horas del cultivo. Finalizado el tiempo de incubación se colectaron los sobrenadantes y se congelaron (-80°C) para su posterior análisis. La cuantificación de citocinas se realizó utilizando un kit personalizado *Magnetic Luminex Screening Assay* (R&D Systems, Minneapolis, USA), en el cual se incluyeron: IL-2, IL-33, IL-22, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IL-17A, CCL2, CCL5, CCL17 e IFN- γ . La adquisición y análisis de las muestras se realizó en el instrumento MagPix (Luminex, Texas, EU).

5.10. Análisis estadístico: El análisis fue realizado con el programa GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA). Se utilizó la prueba no-paramétrica de U-Mann-Whitney para calcular la significancia estadística entre los diferentes grupos. Todos los valores de p menores a 0.05 fueron considerados como estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS.

6.1 Identificación de una población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} con características compartidas de células linfoides y basófilos en sangre periférica.

Con el objetivo de evaluar la presencia de células linaje negativas CD123⁺ en SP de individuos sanos; se realizó el análisis de CMSP por citometría de flujo, de las cuales se seleccionó la región de linfocitos y para la exclusión de células “linaje positivas”, se utilizaron los anticuerpos: anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD94 y anti-HLA-DR (para la exclusión de linfocitos T, monocitos, linfocitos B, células NK y células dendríticas respectivamente); como se muestra en la Figura 4A, dentro de la región denominada como “linaje negativa” fue posible identificar al menos a dos poblaciones: Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺ con frecuencias dentro de las CMSP totales de 0.75-1.4% y 0.094-0.15% respectivamente. La expresión de CD127 (IL-7R α) en la población denominada como Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} fue determinada por citometría de flujo y confirmada por PCR (Figura 1B).

Posteriormente para descartar la expresión de diversos marcadores asociados a distintos linajes en la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}, así como para descartar la presencia de células contaminantes pertenecientes a otras estirpes; se analizó la expresión de diversos marcadores clásicos de distintos linajes: CD34 (células progenitoras), TCR $\alpha\beta$ (linfocitos T), IL-5R, CD177 y CD66 (granulocitos) y CD16 (neutrófilos y monocitos); en la figura 1C se muestra que las dos poblaciones analizadas fueron negativas para todos los marcadores evaluados (Figura 4C).

Debido a que la expresión de CD123 (IL-3R α) ha sido descrita también en células dendríticas, se determinó la expresión de los marcadores CD11c, BDCA-1-4 y HLA-DR en la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y se comparó con respecto a las poblaciones de células dendríticas convencionales (cDCs) y plasmacitoides (pDCs) para descartar la presencia de éstas células dentro de la población analizada (Figura 4D). Adicionalmente al incluir el anticuerpo anti-Fc ϵ R dentro del coctel para la exclusión de células “linaje positivas”, observamos que no era posible identificar a la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} en SP, debido a la expresión del Fc ϵ R en dicha población, por lo que en análisis posteriores no fue incluido como parte del cóctel de anticuerpos

utilizados para la exclusión de células “linaje positivas” (Figura 4E). Sin embargo, en el análisis de muestras de sangre de cordón umbilical, siguiendo esta misma estrategia, se logró identificar a la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$, aún utilizando el anticuerpo anti-FcεR dentro del cóctel de exclusión de células linaje positivas, no obstante en menor porcentaje que cuando no se incluyó (Figura suplementaria 1); lo cual sugiere que la expresión del FcεR puede ser regulada durante las diferentes etapas de diferenciación.

De acuerdo a estos resultados fue posible identificar a la población $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ como ILC clásicas descritas en SP y adicionalmente a la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$. Con respecto a la expresión del FcεR observada, para descartar la presencia de basófilos en la población identificada, se evaluó la expresión de CD203c, CCR3 y del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-2D7 presente en los gránulos de basófilos.

Para este análisis se siguieron dos estrategias de análisis mostradas en la figura 5A-B; en la primer estrategia se analizaron las células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ y posteriormente de acuerdo a tamaño y granularidad (FSC vs. SSC); en la segunda, primero se realizó el análisis con respecto a tamaño y granularidad y posteriormente se realizó la identificación de las células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$, siguiendo cualquiera de las dos estrategias, fue posible identificar dos poblaciones CD123^+ , clasificadas como $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ (\text{FSC}^{\text{int}} \text{SSC}^{\text{int}})$ y $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ (\text{FSC}^{\text{low}} \text{SSC}^{\text{low}})$, de acuerdo a esta clasificación se realizó el análisis de los marcadores FcεR, CD203c, CCR3 y 2D7 (Figura 5C), el cual mostró que ambas poblaciones expresan niveles basales similares de FcεR y CD203c, y que la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ (\text{FSC}^{\text{low}} \text{SSC}^{\text{low}})$ tiene una menor expresión de CCR3 y 2D7. Posteriormente al realizar el análisis por citometría de flujo con imágenes, fue posible determinar que dentro de la población total de células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ existe una mezcla de células linfoides (núcleo no lobulado) y células con morfología basofílica clásica (núcleo lobulado) como se muestra en la figura 5D-E.

Los resultados anteriores pusieron de manifiesto la heterogeneidad de la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$, mostrando que existen al menos dos poblaciones que pueden ser distinguidas por tamaño y granularidad: $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ (\text{FSC}^{\text{int}} \text{SSC}^{\text{int}})$ y $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ (\text{FSC}^{\text{low}} \text{SSC}^{\text{low}})$, morfología del núcleo y expresión basal de los marcadores FcεR, CD203c, CCR3 y 2D7. Adicionalmente, el análisis

comparativo de la expresión de CD127 y CD7 (utilizados como marcadores linfoides) en diferentes poblaciones de SP (figura 5 G-E) mostró nuevamente diferencias entre las poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ ($\text{FSC}^{\text{int}} \text{SSC}^{\text{int}}$) y $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ ($\text{FSC}^{\text{low}} \text{SSC}^{\text{low}}$), esta última presentando una expresión basal mayor de dichos marcadores; el análisis de la expresión de estos marcadores en monocitos (CD14^+) sirvieron como control negativo al considerarse como células de origen mieloide, estos resultados mostraron que en SP existe una población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ ($\text{FSC}^{\text{low}} \text{SSC}^{\text{low}}$), con características linfoides y que comparte características fenotípicas con los basófilos.

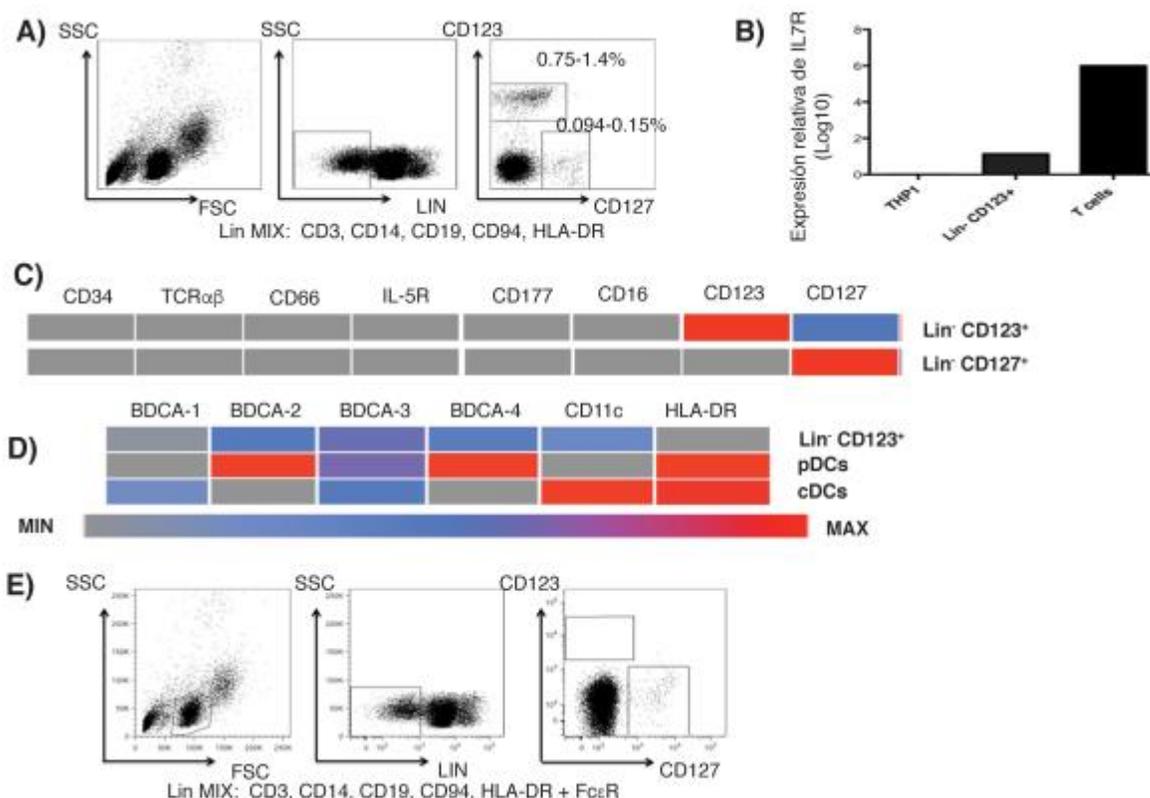


Figura 4. Identificación de dos poblaciones “linaje negativo” (Lin^-) en SP con expresión diferencial de CD127.

A) De izquierda a derecha se muestra la estrategia de análisis a partir de células linfoides, la exclusión de células “linaje positivas” y la identificación de las poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ y $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^+$, con sus respectivas frecuencias (%) dentro de las CMSP, estos valores son representativos de 30 muestras de sangre de individuos sanos. En B) células aisladas por citometría de flujo de la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ provenientes de tres individuos sanos, fueron utilizadas para evaluar la expresión de $\text{IL-7R}\alpha$ mediante RT-PCR cuantitativa. La línea celular monocítica THP1 fue utilizada como control negativo y la expresión relativa fue normalizada de acuerdo a los valores de expresión de GAPDH. En C) y D) se muestran los “heat-maps” representativos de al menos tres experimentos independientes. Los valores de las medianas de fluorescencia (MF) para la exclusión de linajes adicionales y marcadores de células dendríticas fueron utilizados para la construcción de los mapas. La escala de color en la parte inferior, indica los códigos de color con respecto a los valores mínimos (gris) y máximos (rojo) obtenidos

con respecto a cada isotipo. pDCs: células dendríticas plasmacitoides, cDCs: células dendríticas convencionales. En E) Identificación de las poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ incluyendo anti-FcεR para la exclusión de células linaje positivas.

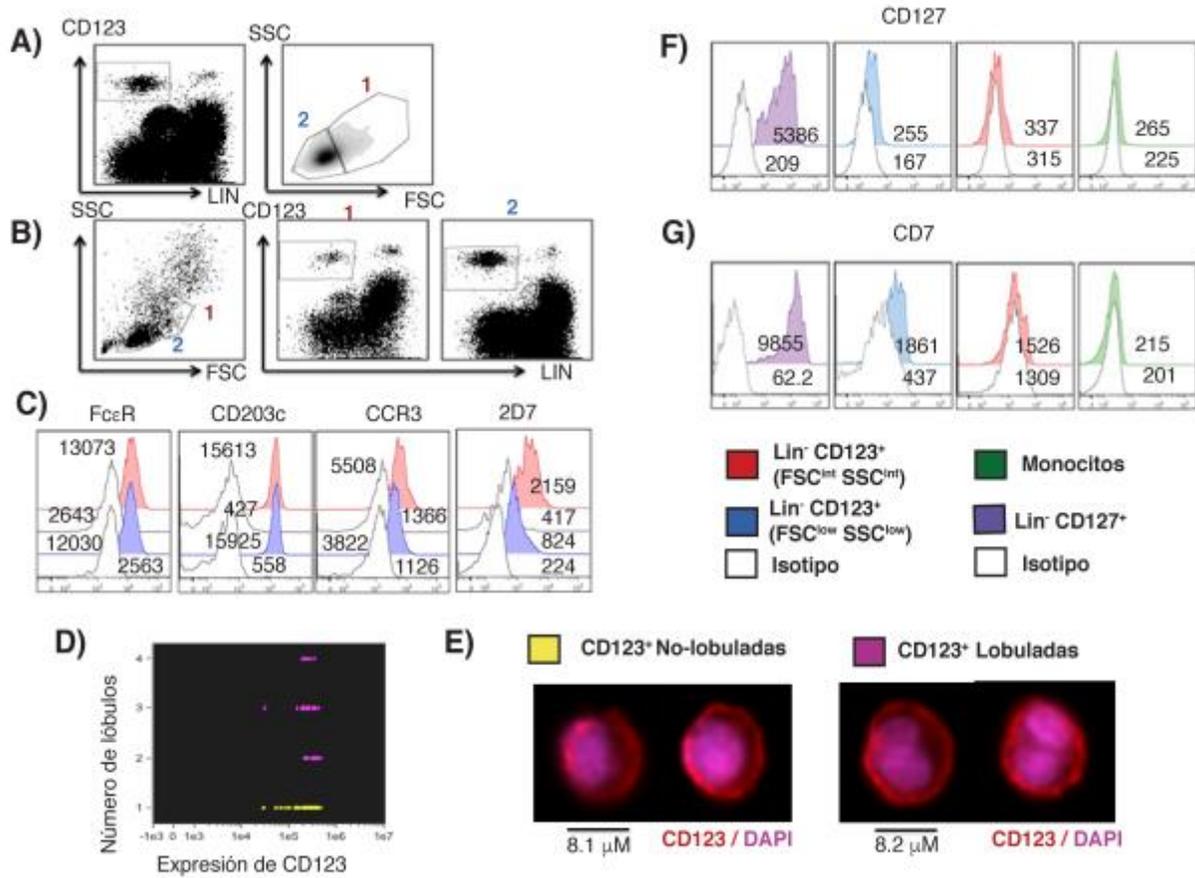


Figura 5. La población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ presente en SP presenta características compartidas con basófilos y células linfoides.

A) y **B)** Análisis comparativo utilizando dos estrategias de análisis. A: $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ y posteriormente FSC vs. SSC y B: FSC vs. SSC seguido por Lin^- vs. CD123^+ . Ambas estrategias de análisis permitieron identificar dos poblaciones: $\text{FSC}^{\text{int}} \text{SSC}^{\text{int}}$ (1) y $\text{FSC}^{\text{low}} \text{SSC}^{\text{low}}$ (2) con frecuencias dentro de las CMSP de 0.3–1.1% and 0.7–1.3% respectivamente. En **C)** Expresión de marcadores de basófilos en las dos poblaciones identificadas como en el panel B. En **D)** y **E)** análisis de citometría de flujo con imágenes de la población enriquecida $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$, la gráfica en D, muestra la expresión de CD123 vs. el número de lóbulos, lo cual permite clasificar en al menos dos poblaciones a las células analizadas: amarillo: no lobuladas y rosa: células lobuladas; en **E)** se muestran fotos representativas de la morfología de las células de cada población (para el análisis se utilizaron 50 células de cada población). En **F)** y **G)** Expresión de CD127 y CD7 en diferentes poblaciones de SP. Rojo: $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ (\text{FSC}^{\text{int}} \text{SSC}^{\text{int}})$, blue: $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ (\text{FSC}^{\text{low}} \text{SSC}^{\text{low}})$ [identificada como en B], morado: $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$, verde: monocitos, blanco: control de isotipo para cada población. Los valores de MF son representativos de tres experimentos independientes.

6.2 La población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} (FSC^{low} SSC^{low}) de SP expresa múltiples marcadores de ILCs incluyendo el factor transcripcional ID2.

De acuerdo a los resultados anteriores, en donde se determinó que la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} (FSC^{low} SSC^{low}) posee características linfoides, se realizó un análisis comparativo utilizando la población Lin⁻ CD127⁺ como referencia, para determinar la expresión de marcadores comúnmente utilizados en la identificación y caracterización de subpoblaciones de ILC (Figura 6A).

Los resultados obtenidos muestran, que la expresión de los marcadores CD90 y CD132 (utilizados como marcadores comunes de ILC) fue mayor en las células Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}, la expresión de CD161 fue menor en las células Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y ambas poblaciones mostraron una expresión similar de la integrina $\alpha 4$, cuya expresión ha sido reportada en precursores de ILC en ratón. La expresión de diversos marcadores relacionados con distintas subpoblaciones de ILC mostraron que la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} posee una mayor expresión basal de c-Kit, CRTH2, AhR y del IL-23R comparadas con la población Lin⁻ CD127⁺.

De igual forma, se analizó en ambas poblaciones la expresión del factor transcripcional ID2, el cual ha sido utilizado para identificar poblaciones de ILC y el cual es crucial dentro de la ontogenia de ILC, los resultados obtenidos muestran (Figura 6B-F) que la tinción a partir de células Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺ expresan dicho factor predominantemente en el núcleo. En conjunto estos resultados muestran que la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} además de compartir la expresión de diversos marcadores utilizados para la identificación de ILC con la población Lin⁻ CD127⁺, considerada como la población de ILC “clásicas”, expresa ID2 uno de los factores transcripcionales clave, relacionado no solo con la identificación si no con la diferenciación y compromiso celular hacia linaje de ILC.

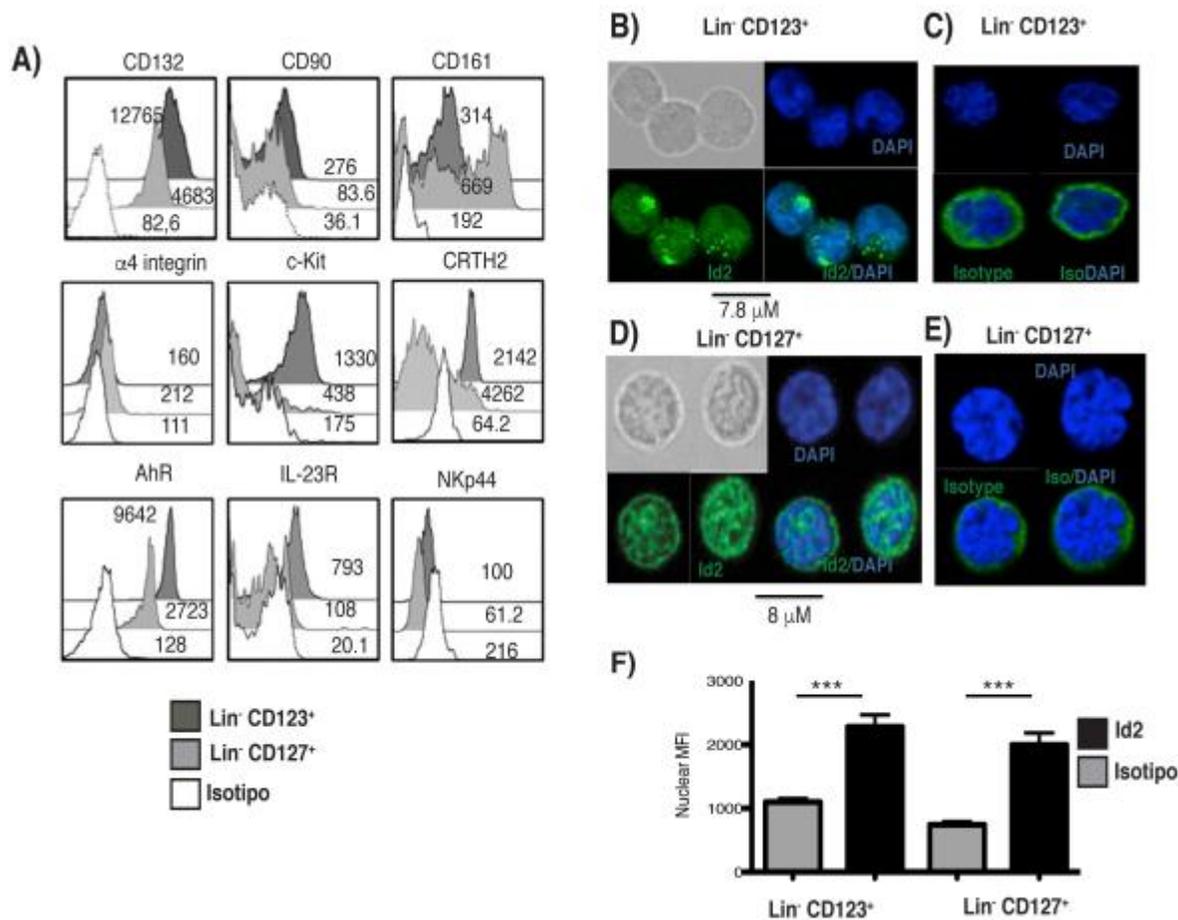


Figura 6. La población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} (FSC^{low} SSC^{low}) de SP expresa múltiples marcadores de ILCs incluyendo el factor transcripcional ID2.

A) Expresión comparada de marcadores característicos de ILC en las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺. En **B)** Expresión del Inhibidor de unión a ADN 2 (ID2) en células Lin⁻ CD123⁺. **C)** control de isotipo. **D)** Expresión de ID2 en células Lin⁻ CD127⁺. **E)** control de isotipo. Verde: Tinción de inmunofluorescencia para ID2. Azul: tinción nuclear con DAPI, n = 10. **F)** Intensidad media de fluorescencia nuclear de ID2 en las células Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺ comparada con el control de isotipo (**p < 0.0001).

6.3 La IL-3 incrementa la sobrevida y regula la expresión de NFIL3 en la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}.

Una vez establecidas las características fenotípicas de la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}, se evaluó el efecto de la IL-3 sobre la sobrevida y expresión de NFIL3 y otros factores de transcripción (PLZF, TOX y TCF-1), cuya expresión está directamente relacionada con el desarrollo y diferenciación de ILC.

De manera interesante los resultados mostraron que la IL-3 es un factor clave en la sobrevida de estas células, ya que al aislarlas a partir de sangre periférica (de acuerdo a la estrategia del Anexo 2) y cultivarlas en presencia de esta citocina durante tres días, el porcentaje de células viables fue alrededor del 90% comparado con un 5% de viabilidad obtenido cuando fueron cultivadas únicamente con RPMI suplementado (la identificación de células muertas y en apoptosis fueron evaluadas mediante la tinción con yoduro de propidio y anexina V) (Figura 7A).

Con respecto a los factores de transcripción, la expresión basal y después de 18 horas de cultivo en presencia de IL-3 fue evaluada en las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺, como se muestra en la figura 7B-E. Los resultados muestran que ambas poblaciones poseen una expresión basal de NFIL3, la población Lin⁻ CD127⁺ tiene una mayor expresión basal de PLZF y TOX y la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} del factor TCF-1. Notablemente, la expresión de NFIL3, PLZF y TOX se incrementó en la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} en presencia de IL-3 y no en la población Lin⁻ CD127 (Figura 7B-D). Cabe mencionar, que la expresión de NFIL3, PLZF y TOX tampoco se modificó en respuesta a la estimulación con IL-7 tanto en la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} como en la población Lin⁻ CD127⁺ (Anexo 3). En conjunto estos resultados sugieren que la IL-3 puede regular la expresión de factores clave en la diferenciación de ILC y que además es capaz de mantener la sobrevida de la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}.

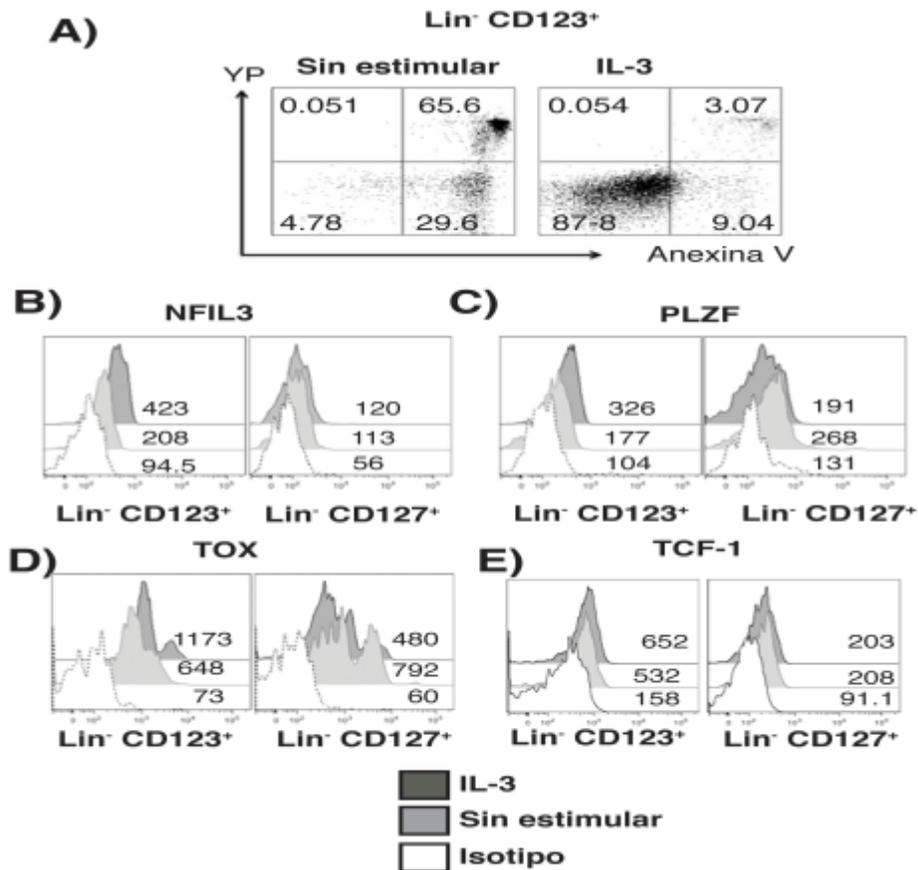


Figura 7. La IL-3 es capaz de incrementar la sobrevivencia y regular la expresión de factores transcripcionales tipo ILC de la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}.

A) Ensayo de viabilidad realizado con células Lin⁻ CD123⁺ (aisladas por citometría de flujo) y cultivadas durante 3 días +/- IL-3. Los porcentajes de células muertas y viables se muestran en cada cuadrante de acuerdo a la expresión de Anexina V y la tinción con Yoduro de Propidio. Las gráficas de puntos son representativas de tres experimentos independientes. **B-E):** Comparación de la expresión de los factores transcripcionales: NFIL3, PLZF, TOX y TCF-1 +/- IL-3 (18 hrs.) en las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺. Gris: sin estimular, negro: + IL-3, punteado: control de isotipo. Los valores de Medianas de Fluorescencia (MF) mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

6.4 La población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} en SP presenta principalmente un fenotipo tipo ILC2, y co-expresa los factores T-bet y ROR γ t.

En conjunto, los resultados anteriores mostraron que la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} en SP, comparte diversas características fenotípicas con las ILC clásicas. Con el objetivo de determinar si esta población presente en SP, podía ser clasificada dentro de alguna de las subpoblaciones de ILC descritas, se realizó el análisis de marcadores descritos para cada subpoblación y se realizó la comparación con la población de ILC clásicas (Lin⁻ CD127⁺).

Como puede observarse en la figura 8A, determinamos que la mayoría de células Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} CD161^{low} pueden ser clasificadas como ILC2 de acuerdo a la expresión de CRTH2, aunque es importante mencionar que la expresión de este, puede a su vez considerarse como un marcador compartido con basófilos. Solo una pequeña proporción de células fueron identificadas como ILC1 (c-Kit⁻, CRTH2⁻) e ILC3 (c-Kit⁺, CRTH2⁻, NKp44⁻). Por otra parte al realizar el mismo análisis de subpoblaciones sobre la población Lin⁻ CD127⁺, encontramos una mayor diversidad de fenotipos, primero de acuerdo a la expresión de CD161, es posible identificar dos poblaciones: CD161^{low} y CD161^{hi} (Figura 8B), el análisis posterior se realizó sobre todas las células CD161⁺, de las cuales es posible observar que solo alrededor de un 20% presenta un fenotipo ILC2, y que el resto de células CRTH2⁻, se dividen entre el fenotipo ILC1 (c-Kit⁻) e ILC3 (c-Kit⁺, NKp44⁺); la presencia de ILC3 NKp44⁺, no fue observada en ninguno de los casos. Es importante mencionar que al realizar este mismo análisis en las muestras de cordón umbilical (Anexo 1), se obtuvo una distribución muy similar de subpoblaciones con respecto a SP, es decir dentro de la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}, el fenotipo predominante es el de ILC2; y en la población Lin⁻ CD127⁺ se observaron las 3 subpoblaciones de ILC.

Además de los marcadores de superficie descritos para cada subpoblación, se evaluó en las poblaciones totales: Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺, la expresión de los factores de transcripción: T-bet (ILC1), GATA-3 (ILC2), ROR γ t (ILC3). Interesantemente encontramos que ambas poblaciones poseen una expresión basal baja de GATA-3 (ligeramente mayor en la población Lin⁻ CD127⁺) y una co-expresión similar de T-bet y ROR γ t (Figura 8C), cabe mencionar que la expresión de dichos factores no se modificó en presencia de la IL-3 (datos no mostrados).

Estos resultados indican que en estado basal en SP, la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$, en contraste con la población $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$, presenta principalmente un fenotipo de ILC2 de acuerdo a los marcadores evaluados. Por otra parte, la expresión de factores de transcripción ha sido relacionada con la capacidad de producción de citocinas, de acuerdo a los resultados mostrados, las dos poblaciones co-expresan los factores de transcripción característicos de las subpoblaciones de ILC (principalmente T-bet y $\text{ROR}\gamma\text{t}$), lo cual sugiere que las dos poblaciones tienen la capacidad de producir diferentes citocinas en respuesta a la activación.

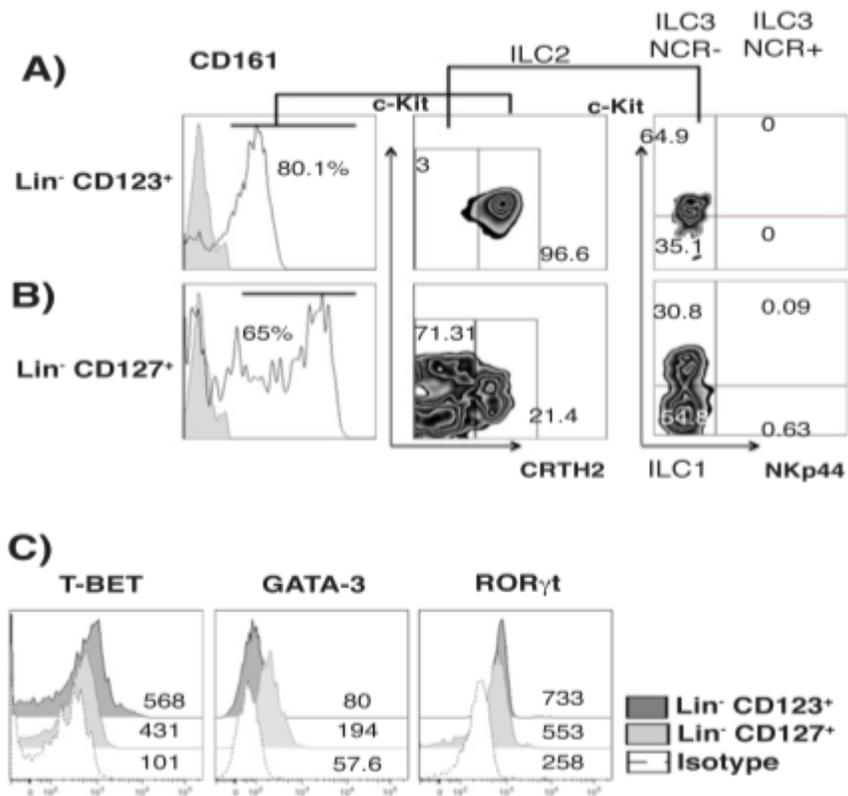


Figura 8. La población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ en SP presenta principalmente un fenotipo tipo ILC2, con co-expresión de los factores T-bet y $\text{ROR}\gamma\text{t}$.

Clasificación de las subpoblaciones de ILC, analizadas como células CD161^+ y posteriormente para ILC1 ($\text{CRTH2}^- \text{c-Kit}^+$), ILC2 (CRTH2^+) e ILC3 ($\text{CRTH2}^- \text{c-Kit}^+$) dentro de las poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ (A) y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ (B). En C) se muestra la expresión de los factores transcripcionales: T-bet, GATA-3 y $\text{ROR}\gamma\text{t}$ en las poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$. Negro: $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$, gris: $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$, punteado: control de isotipo. Los valores de Medianas de Fluorescencia (MF) mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

6.5 La población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} de SP expresa diversas citocinas tipo Th.

De acuerdo a los resultados mostrados de la co-expresión de factores de transcripción en las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺ de SP, se realizaron los ensayos de activación con PMA/Ionomicina, para evaluar la expresión de citocinas descritas para las diferentes poblaciones de ILC1, ILC2 e ILC3. Ambas poblaciones mostraron que son capaces de expresar IFN- γ , IL-2 e IL-4, siendo la población Lin⁻ CD127⁺ en la que se detectó un mayor porcentaje de células productoras de IL-2 e IL-4, y un porcentaje muy bajo de células productoras de IL-22 (Figura 9B), la producción de IL-17, no se detectó en ninguna de las dos poblaciones. Por otra parte, como puede observarse en la figura 9A, las células productoras de IL-2 e IL-4 dentro de la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} desregulan la expresión de CD123. Por otra parte, debido a que la expresión de citocinas en ILC ha sido evaluada principalmente en respuesta a diferentes cocteles de activación; ILC1: IL-12 e IL-15, ILC2: IL-2 e IL-33, ILC3: IL-1 β , IL-2 e IL-23, se realizaron los respectivos ensayos de activación utilizando dichos cocteles, en los cuales se incluyeron también a la IL-3 e IL-7, con el objetivo de mantener la viabilidad de las células durante la activación; los resultados obtenidos de estos experimentos mostraron que únicamente el coctel de activación ILC1, indujo la expresión de IFN- γ en las dos poblaciones analizadas (Figura 10A). Estos resultados sugieren que en SP las dos poblaciones: Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺, independientemente del fenotipo determinado por marcadores de superficie y factores de transcripción, poseen una mayor capacidad de respuesta (o pre-programación) para la producción IFN- γ (tipo ILC1) y una limitada capacidad de producción de otras citocinas tipo Th.

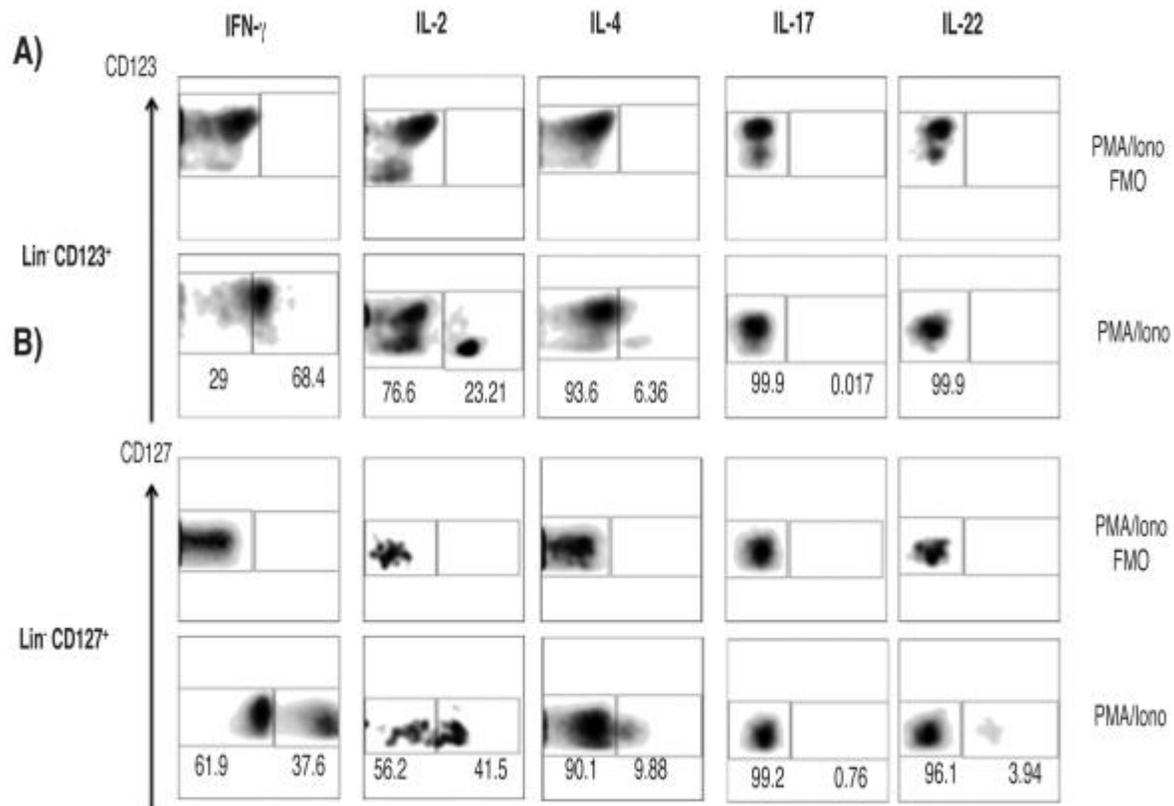


Figura 9. La población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} de SP expresa diversas citocinas tipo Th.

Porcentajes de células positivas y negativas para la expresión de: IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-17 e IL-22 cultivadas en presencia de PMA/Iono (6hrs), dentro de las poblaciones **A)** Lin⁻ CD123⁺ y **B)** Lin⁻ CD127⁺ (a partir de CMSP). En cada panel, se muestran los controles de Fluorescencia Menos Uno (FMO) en la parte superior. Las gráficas de densidad mostradas son representativas de al menos tres experimentos independientes.

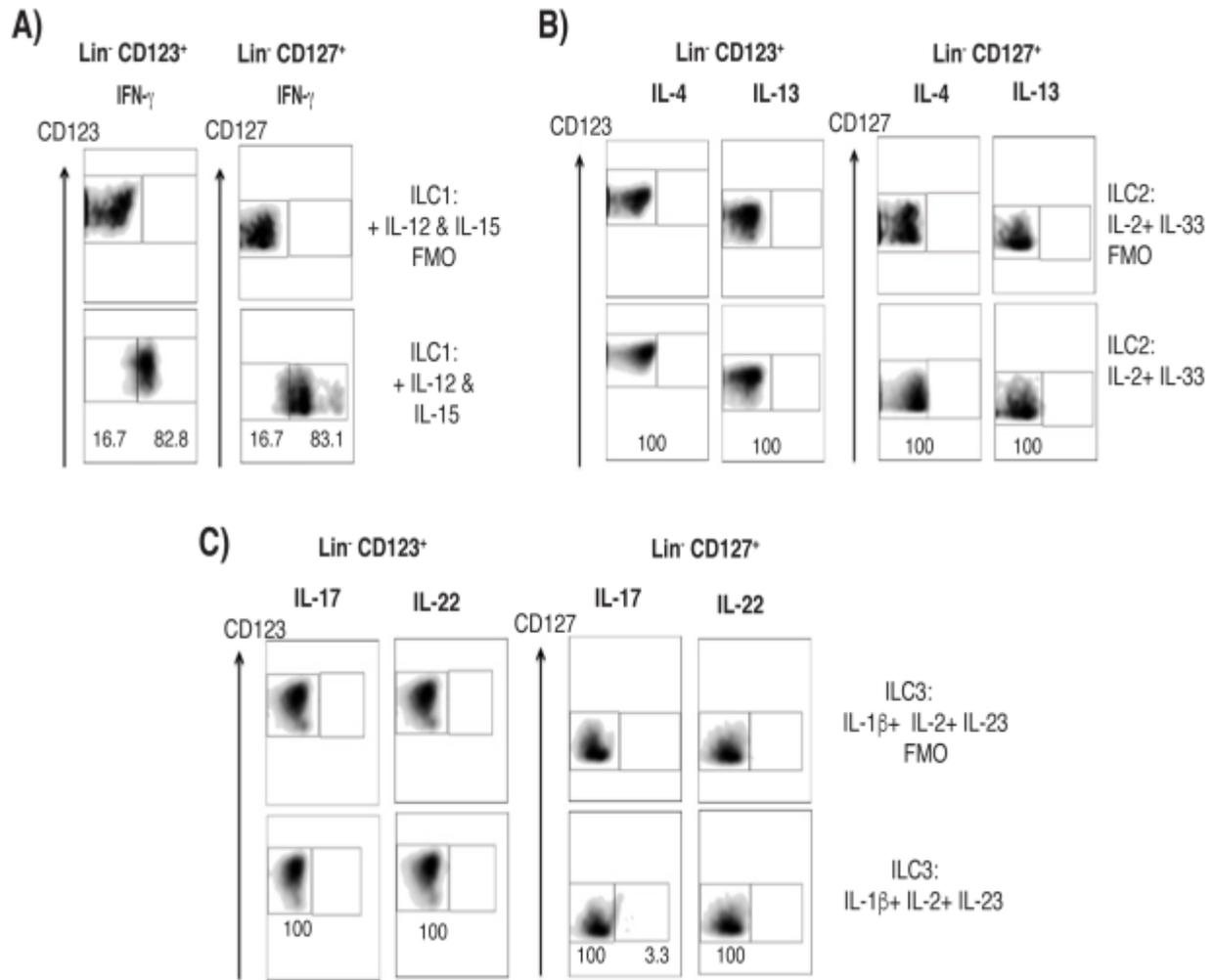


Figura 10. Las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺ de SP, responden a IL-15 e IL-18 mediante la producción de IFN γ .

A) Expresión de IFN γ en células cultivadas +/- el cóctel de activación de ILC1 (18 hrs.). **B)** Expresión de IL-4 e IL-13 en células cultivadas +/- el cóctel de activación de ILC2 (18 hrs.). **C)** Expresión de IL-17 e IL-22 en células cultivadas +/- el cóctel de activación de ILC3 (18 hrs.). La expresión de todas las citocinas se analizó en las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺ (a partir de CMSP). En cada panel, se muestran los controles de Fluorescencia Menos Uno (FMO) en la parte superior. Las gráficas de densidad mostradas son representativas de al menos tres experimentos independientes.

6.6 La población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} en SP produce adicionalmente IL-8.

Con el objetivo de ampliar el panel de citocinas evaluado y confirmar la producción de citocinas observada en los experimentos anteriores (en donde se utilizaron CMSP totales); se realizaron ensayos de activación con PMA/Iono y el cóctel de activación ILC1 con células aisladas Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺ para posteriormente determinar la cantidad de citocinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos celulares. Los resultados mostrados en la figura 11A muestran que las únicas citocinas que se detectaron en los cultivos de las células Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} fueron la IL-4 y la IL-8, la producción de esta última citocina se indujo en respuesta a la IL-3 y el estímulo combinado de PMA/Ionomicina con IL-3 indujo una mayor producción de ambas citocinas. Debido a la limitada cantidad de células Lin⁻ CD127⁺ que fue posible aislar a partir de SP, únicamente se determinó la producción de IL-8 e IL-2 en respuesta a la activación con PMA/Ionomicina (datos no mostrados).

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivo, mediante tinción intracelular, se confirmó la expresión de la IL-8 en células Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺ (a partir de CMSP). En los resultados de la figura 11B se puede observar que ambas poblaciones expresan IL-8 después de la activación con PMA/Iono, pero que dentro de la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} existe un mayor porcentaje de células IL-8⁺. En la figura 11C se muestran los resultados de cinco experimentos independientes en donde se comparó la expresión de IL-8 en ambas poblaciones cultivadas bajo distintas condiciones; la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} expresa IL-8 en respuesta a IL-3 y PMA/Ionomicina, en comparación con la población Lin⁻ CD127⁺ la cual solo produce IL-8 en respuesta a PMA/Ionomicina.

Finalmente, para confirmar los resultados se realizaron tinciones intracelulares a partir de células Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} aisladas por citometría de flujo, en donde fue posible observar el mismo comportamiento que en los sobrenadantes, ya que después de la activación con PMA/Ionomicina, únicamente fue posible detectar la expresión de IL-8 e IL-4 (Figura 11D). En conjunto estos resultados indican que la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} presente en SP en estado basal, como respuesta a la activación mediada tanto por IL-3 como PMA/Ionomicina es capaz de expresar altos niveles de IL-8 y se confirmó que ambas poblaciones Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺ mostraron una limitada capacidad de producción de citocinas tipo Th.

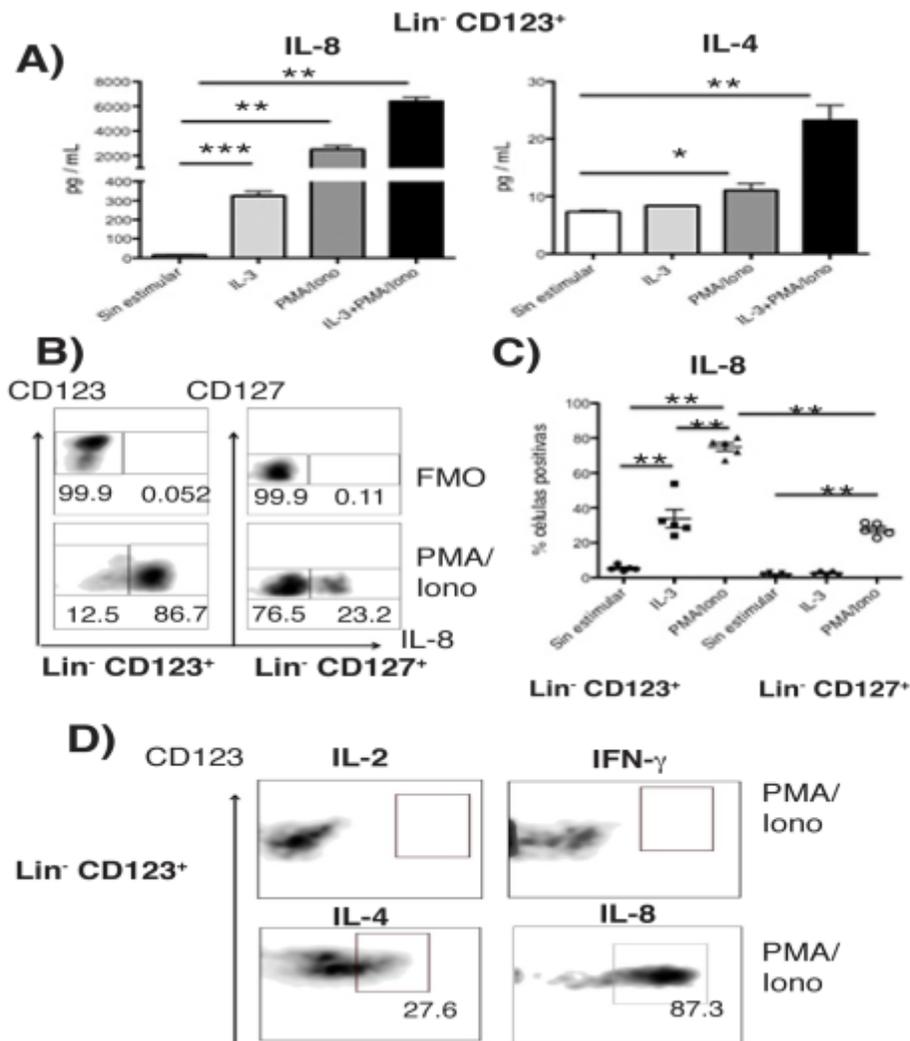


Figura 11. Figura 11 La población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ en SP produce adicionalmente IL-8.

A) Cuantificación de IL-8 e IL-4 en sobrenadantes de cultivos de células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ (aisladas por citometría de flujo) y cultivadas +/- IL-3, PMA/Iono o IL-3 + PMA (18 hrs). **B)** Porcentajes de células positivas y negativas para la expresión de IL-8 (panel inferior) +/- PMA/Iono (6 hrs) en las poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ (a partir de CMSP). Panel superior: control de Fluorescencia Menos Uno (FMO) para cada población. **C)** Porcentajes de células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ IL-8⁺ (a partir de CMSP) cultivadas +/- IL-3 o PMA/Iono durante 18 hrs. (n=5) (PMA/Iono se añadió durante las últimas 6 hrs. de cultivo). **D)** Expresión de IFN γ , IL-2, IL-4 e IL-8 en células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ (aisladas por citometría de flujo) cultivadas +/- PMA/Iono durante 6 hrs. Las gráficas de densidad mostradas son representativas de al menos tres experimentos independientes. (**p < 0.01, *** p < 0.001).

6.7 La población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} proveniente de la región linfoide disminuye la expresión de CD123 y de marcadores de basófilos después de activación.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las tinciones intracelulares para la expresión de citocinas, pudimos observar que las células Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} que expresaron las diferentes citocinas después de la activación con PMA/Ionomicina, fueron principalmente una proporción la cual disminuyó la expresión de CD123 (Figura 9A). Adicionalmente, al realizar el análisis de células Lin⁻ CD123⁺ como se muestra en la figura 5A en donde se identificaron dos poblaciones: Lin⁻ CD123⁺ (FSC^{int} SSC^{int}) y Lin⁻ CD123⁺ (FSC^{low}SSC^{low}), encontramos diferencias en la expresión de marcadores compartidos con los basófilos en estado basal y después de activación con PMA/Ionomicina.

En la figura 12A puede observarse que al realizar el análisis sobre la población Lin⁻ CD123⁺ (FSC^{low} SSC^{low}) alrededor del 50% de células Lin⁻ CD123⁺ disminuyen la expresión de CD123, y no así la población Lin⁻ CD123⁺ (FSC^{int} SSC^{int}) en donde la mayoría de las células mantienen la expresión de dicho marcador. Por otra parte, como puede observarse en la figura 12 B y C, la población Lin⁻ CD123⁺ (FSC^{int} SSC^{int}) mantiene también la expresión de FcεR, CCR3 e inclusive incrementa la expresión CD203c después de activación, y la población proveniente de la región linfoide Lin⁻ CD123⁺ (FSC^{low} SSC^{low}) disminuye la expresión de dichos marcadores.

Por otra parte, de acuerdo a la expresión basal del FcεR en las dos poblaciones analizadas, se utilizó un método alternativo de activación, utilizando el entrecruzamiento con IgE (comúnmente utilizado para la activación de basófilos), se evaluó la expresión de IL-8 y 2D7 como parámetros de respuesta a dicha activación. En la figura 12D puede observarse que únicamente la población Lin⁻ CD123^{low} (FSC^{low} SSC^{low}) es capaz de expresar IL-8 después de la activación con PMA/Ionomicina y no así cuando se utilizó la IgE. Por otra parte, las dos poblaciones disminuyeron la expresión de 2D7 en respuesta a los estímulos utilizados. Sin embargo, la población Lin⁻ CD123⁺ (FSC^{int} SSC^{int}) es en donde puede observarse que existe una mayor proporción de células 2D7⁺ inclusive después de activación. Estos resultados mostraron diferencias funcionales entre las poblaciones analizadas, los cuales sugieren que la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} (FSC^{low}SSC^{low}) requiere de una activación previa que induzca la disminución del fenotipo basófilo y el incremento de características funcionales tipo ILC.

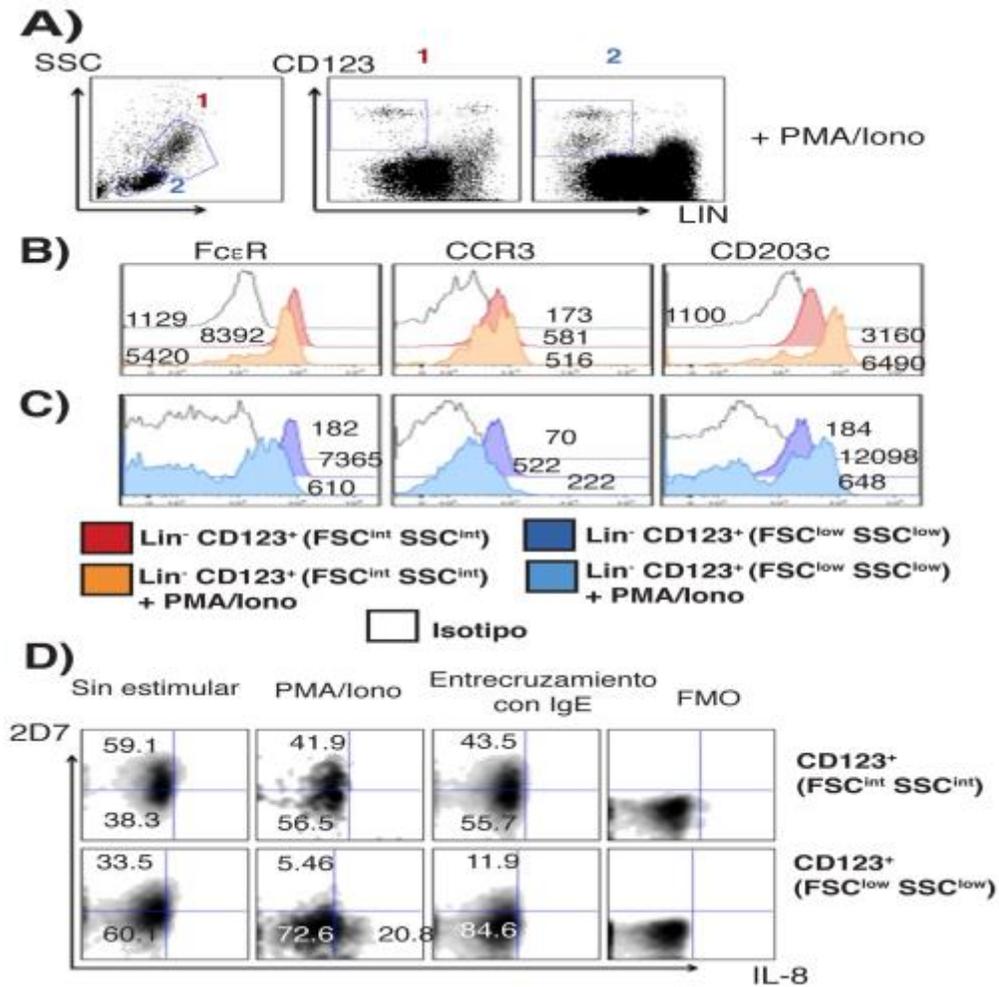


Figura 12. La población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} proveniente de la región linfoide disminuye la expresión de CD123 y de marcadores de basófilos después de activación.

A) Identificación de las poblaciones: Lin⁻ CD123⁺ FSC^{int} SSC^{int} (1) y Lin⁻ CD123⁺ FSC^{low} SSC^{low} (2) a partir de CMSP después de 6 hrs de cultivo +/- PMA/Iono. **B)** y **C)** Expresión de marcadores de basófilos después de activación con PMA/Iono en las poblaciones: Lin⁻ CD123⁺ FSC^{int} SSC^{int}. Rojo: sin estimular. Naranja: + PMA/Iono y Lin⁻ CD123⁺ FSC^{low} SSC^{low} y Lin⁻ CD123⁺ FSC^{low} SSC^{low}. Azul oscuro: sin estimular. Azul claro: + PMA/Iono. Blanco: Isotipo. Los valores de Medianas de Fluorescencia (MF) mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. **D)** Expresión de 2D7 e IL-8 después de activación con PMA/Iono (6 hrs.) o entrecruzamiento con IgE humana (2 hrs). Panel superior: Lin⁻ CD123⁺ FSC^{int} SSC^{int} y panel inferior: Lin⁻ CD123⁺ FSC^{low} SSC^{low}. El control de Fluorescencia Menos Uno (FMO) para cada población se muestra a la derecha de cada panel. Las gráficas de densidad mostradas son representativas de al menos tres experimentos independientes.

6.8 La población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ expresa marcadores involucrados con el reclutamiento a tejidos periféricos como piel.

Las ILC en SP, han sido propuestas como células precursoras o inmaduras, capaces de migrar en condiciones homeostáticas y de inflamación a diversos tejidos (entre ellos piel), en donde se propone pueden ser posteriormente activadas o diferenciadas. La migración de estas poblaciones celulares ha sido asociada con la expresión de diversas moléculas que pueden guiar su redistribución desde sangre periférica a tejidos.

De acuerdo con los resultados obtenidos para las poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ de SP, en donde se observó una limitada producción de citocinas, lo cual correspondería con un fenotipo inmaduro, decidimos evaluar la expresión de diversos marcadores de migración (CLA, CXCR4, CD62L y CCR6) con el objetivo de determinar si en condiciones homeostáticas, las poblaciones de SP poseen la capacidad de redistribuirse a tejidos periféricos y así poder evaluar cuáles son sus características fenotípicas y funcionales como células residentes de un tejido. Los resultados en la figura 13, muestran que la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ posee una alta expresión del Antígeno Leucocitario Cutáneo (CLA), CXCR4, CD62L y una expresión baja de CCR6. En comparación la población $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ tiene una menor expresión de CLA, CXCR4, CD62L y solo la expresión de CCR6 resultó ser mayor en esta población (figura 13 B).

Estos resultados nos sugirieron que debido a la alta expresión de CLA, uno de los tejidos blanco al cual puede migrar la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$, en condiciones de homeostasis es la piel. Por lo cual se evaluó si en piel de individuos control, existía una población con características fenotípicas y funcionales similares a las observadas en SP. Cabe mencionar que la expresión de otros marcadores como CXCR4, CD62L y CCR6, puede relacionarse con la migración hacia otros órganos como ganglios linfáticos e intestino; sin embargo, debido a la alta expresión de CLA y la disponibilidad para analizar muestras de piel como tejido blanco, se realizó el análisis utilizando este tejido; sin embargo, resulta interesante en estudios posteriores evaluar la presencia de esta población en otros órganos.

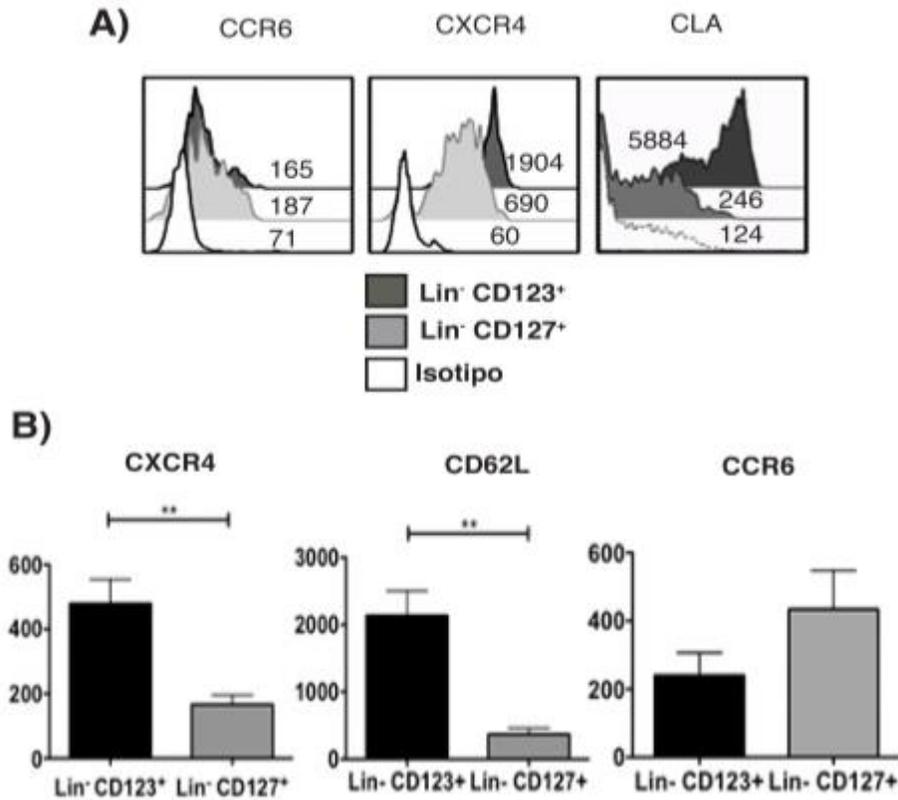


Figura 13. La población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} expresa marcadores involucrados con el reclutamiento a tejidos periféricos como piel.

A) Expresión comparada de los marcadores de migración: CCR6, CXCR4 y CLA en las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺. Negro: Lin⁻ CD123^{low}, Gris: Lin⁻ CD127⁺, Blanco: control de isotipo. Los valores de Medianas de Fluorescencia (MF) mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. **B)** Gráficas de barras representativas de las medianas de fluorescencia (MF) relativas a la expresión de CXCR4 (n = 6), CD62L (n = 5), and CCR6 (n = 6) en las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺ de SP.

6.9 La población $\text{Lin}^- \text{CD123}^{\text{low}} \text{CD127}^{\text{int}}$ con características de ILC se encuentra normalmente infiltrando tejidos como la piel.

De acuerdo a los resultados anteriores, se realizó el análisis de muestras de piel para determinar la presencia de las poblaciones identificadas en SP: $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$. La estrategia de análisis (figura 11A) realizada a partir de células obtenidas de la dermis de individuos control, muestra que utilizando los mismos parámetros que en SP (tamaño, granularidad, exclusión de células linaje positivas y expresión de marcadores) fue posible identificar a dos poblaciones equivalentes. Sin embargo, la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ en dermis, presenta una menor expresión de CD123 y un incremento en la expresión de CD127, por lo que en dermis esta población fue caracterizada como $\text{Lin}^- \text{CD123}^{\text{low}} \text{CD127}^{\text{int}}$. Adicionalmente, en comparación con SP, esta población posee una mayor expresión de CD90, menor expresión de CD132 y CD161. La expresión de los demás marcadores de ILC analizados en esta población (c-Kit, CRTH2, AhR, IL-23R) fue positiva, además se logró observar una población de ILC3 NKp44^+ (Figura 14B y D).

En cuanto a la población $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ presente en dermis, también presentó una mayor expresión de CD90 y menor expresión de CD132 y CD161 con respecto a su equivalente en SP, y en comparación con la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^{\text{low}} \text{CD127}^{\text{int}}$ tiene una menor expresión de los marcadores de ILC analizados. Ambas poblaciones conservan la expresión de moléculas involucradas con la migración (CLA, CXCR4) sin embargo dicha expresión es menor que en SP (Figura 14B).

La expresión de marcadores relacionados con el linaje de basófilos fue de igual manera evaluada en la población de dermis $\text{Lin}^- \text{CD123}^{\text{low}} \text{CD127}^{\text{int}}$; como puede observarse en la figura 14C, esta población es $\text{Fc}\epsilon\text{R}^-$, CCR3^- , CD203c^- , 2D7^- , lo cual es una diferencia importante con respecto a lo observado en la población equivalente en estado basal de SP.

Finalmente al realizar el análisis de subpoblaciones de ILC1, ILC2 e ILC3 con respecto a los marcadores fenotípicos expresados, se puede observar que la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^{\text{low}} \text{CD127}^{\text{int}}$ presenta una mayor diversidad fenotípica con respecto a su equivalente en SP (Figura 8A y 14D), es decir, es posible identificar una mayor proporción de células con fenotipo de ILC1 (c-Kit⁻, CRTH2⁻) e ILC3 (CRTH2⁻, c-Kit⁺, NKp44⁺ y NKp44⁻) y en comparación con SP la proporción

de células con fenotipo de ILC2 (CRTH2⁺) es menor. Por otra parte, al realizar el análisis de la población Lin⁻ CD127⁺, es posible identificar células correspondientes a las 3 subpoblaciones, pero la mayoría de ellas poseen un fenotipo ILC1 (figura 14E).

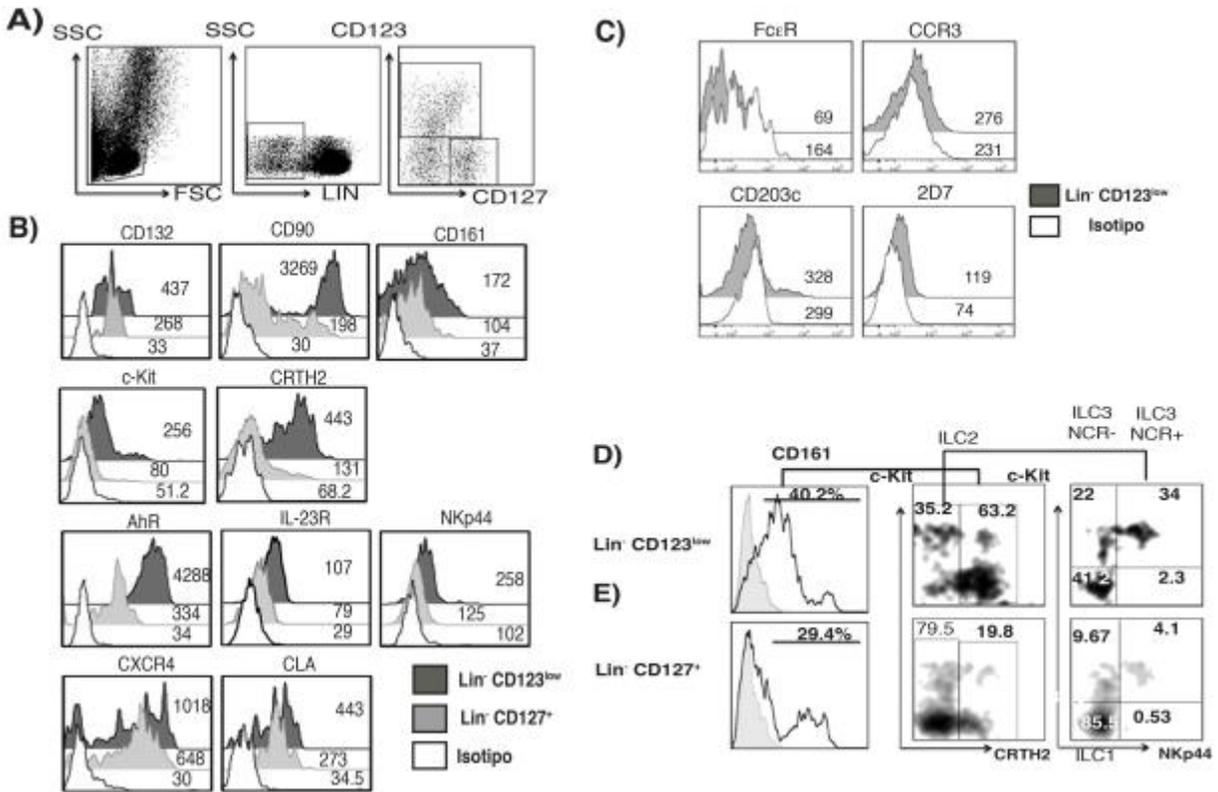


Figura 14. La población Lin⁻ CD123^{low}CD127^{int} con características de ILC se encuentra normalmente infiltrando tejidos como la piel.

Las células totales obtenidas de la dermis de individuos control fueron analizadas siguiendo la misma estrategia que en SP. **A)** De izquierda a derecha: análisis de células linfoides, exclusión de células linaje positivas (CD3⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD94⁺, HLA-DR⁺) e identificación de las poblaciones Lin⁻ CD123^{low} y Lin⁻ CD127⁺. **B)** Expresión comparada de marcadores característicos de ILC en las poblaciones Lin⁻ CD123^{low} y Lin⁻ CD127⁺. **C)** Expresión de marcadores de basófilos en la población Lin⁻ CD123^{low}. Negro: Lin⁻ CD123^{low}, Gris: Lin⁻ CD127⁺, Blanco: control de isotipo. Los valores de Medianas de Fluorescencia (MF) mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. **D)** y **E)** Clasificación de subpoblaciones de ILC en piel: analizadas como células CD161⁺ y posteriormente para ILC1 (CRTH2⁻ c-Kit⁻), ILC2 (CRTH2⁺) e ILC3 (CRTH2⁻, c-Kit⁺) dentro de las poblaciones Lin⁻ CD123^{low} (**D**) y Lin⁻ CD127⁺ (**E**). Las gráficas de densidad mostradas son representativas de al menos tres experimentos independientes.

6.10 Las células Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} de piel producen IL-17 e IL-22.

Como se ha mencionado, la producción de citocinas mediada por ILC ha sido reportada principalmente en tejidos periféricos; de acuerdo a los resultados de la figura 14, al identificarse las poblaciones Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} y Lin⁻ CD127⁺ con características similares a las reportadas en SP, se evaluó la expresión de citocinas en respuesta a la activación con PMA/Ionomicina en estas poblaciones. Se detectó la expresión de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-17, IL-22 e IL-8 por parte de la población Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} (Figura 15A), y se encontró un patrón similar de expresión de citocinas por parte de la población Lin⁻ CD127⁺ presente en SP y dermis (figuras 9B y 15B), excepto que la población Lin⁻ CD127⁺ presente en dermis no expresa IL-4.

A diferencia de los resultados de SP, se logró detectar la expresión de IL-17 e IL-22, después de la activación con PMA/Ionomicina, principalmente en la población Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int}, por lo que adicionalmente evaluamos la activación mediada por un coctel de activación reportado para la producción de estas citocinas por parte de las ILC3, el cual incluyó IL-1 β , IL-2 e IL-23; como se muestra en la figura 15C, la activación con el coctel indujo una muy baja expresión de IL-17 e IL-22 en comparación con la estimulación con PMA/Ionomicina, sin embargo cuando utilizamos el estímulo combinado del coctel más PMA/Ionomicina, puede observarse un incremento en el porcentaje de células IL-17⁺ IL-22⁺. Los resultados obtenidos a partir de las células de piel sugieren que la población Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} en comparación con su equivalente de SP, presenta una mayor diversidad fenotípica (determinada de acuerdo a la expresión de marcadores típicos de ILC1, ILC2 e ILC3 (Figura 14D), lo cual a su vez concuerda con una mayor diversidad de citocinas expresadas en piel después de activación (incluyendo IL-17 e IL-22); adicionalmente la población en piel posee una menor expresión del marcador CD123 y una mayor de CD127 en comparación con SP y no expresa ningún marcador de basófilos (Fc ϵ R, CCR3, CD203 y 2D7), lo cual sugiere que la población Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} además de encontrarse normalmente como residente en piel, se encuentra en un estado de diferenciación distinto al observado en la población equivalente en SP.

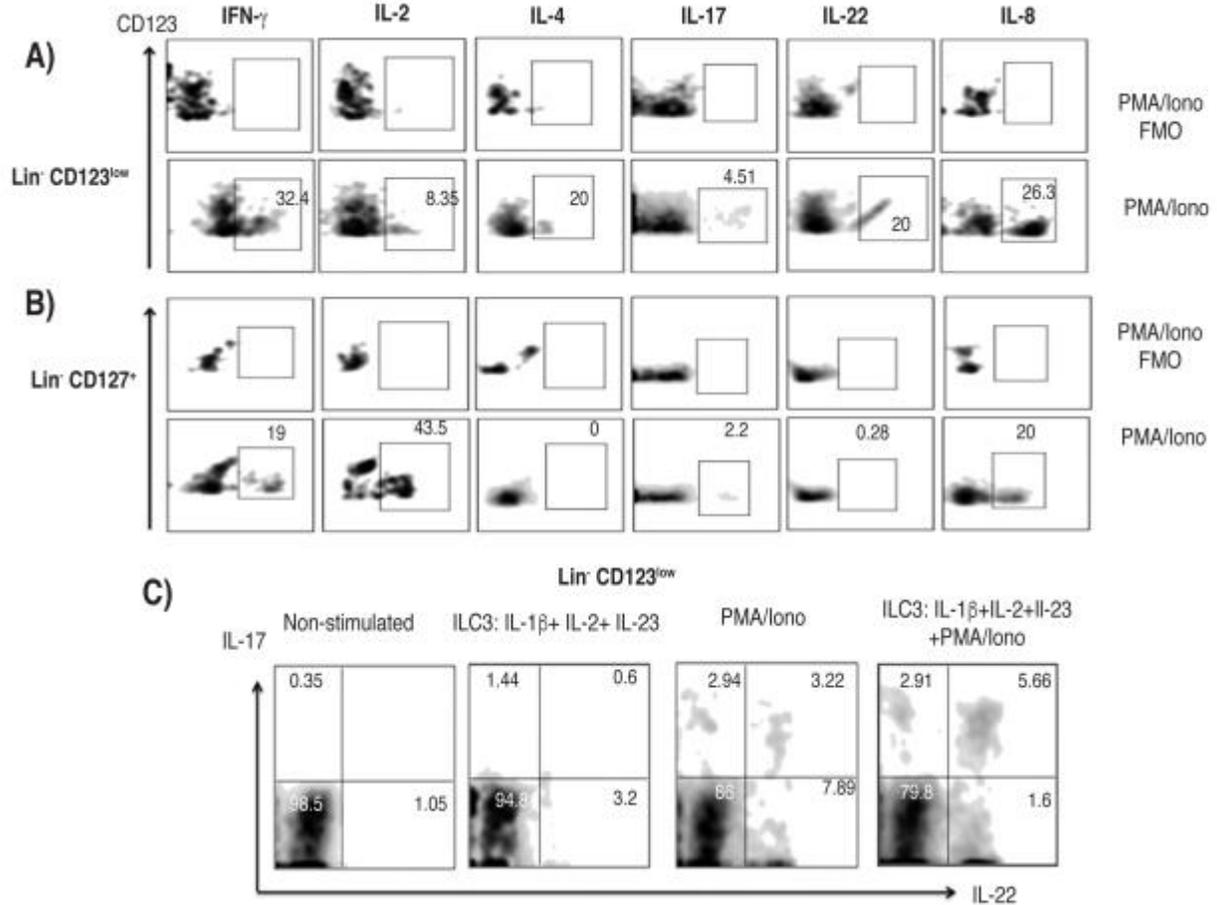


Figura 15. Las células Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} de piel producen IL-17 e IL-22.

A) y **B)** Porcentajes de células positivas y negativas que expresan IFN- γ , IL-2, IL-4; IL-17, IL-22, e IL-8 cultivadas +/- PMA/Iono (6 hrs.) dentro de las poblaciones **A)** Lin⁻ CD123^{low} y **B)** Lin⁻ CD127⁺ (a partir de células totales de dermis de individuos control). Paneles superiores: controles de Fluorescencia Menos Uno (FMO) para cada población. **C)** Expresión de IL-17 e IL-22 en células Lin⁻ CD123^{low} obtenidas de piel y cultivadas +/- cóctel de activación ILC3, PMA/Iono o cóctel de activación ILC3 + PMA/Iono durante 18 horas (PMA/Iono se añadió durante las últimas 6 hrs. de cultivo). Las gráficas de densidad mostradas son representativas de al menos tres experimentos independientes.

7. DISCUSIÓN.

Durante los últimos años se han identificado y clasificado diversas subpoblaciones de ILC basados en los trabajos de investigación hechos en ratón. Sin embargo, los reportes más recientes en humano han demostrado que la diversidad de subpoblaciones de ILC entre individuos y tejidos es aún mayor de lo que se había determinado^{6,59,140}. En el presente trabajo, hemos identificado en SP una población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$, que posee diversas características compartidas con las ILC.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la población identificada se distingue de las pDCs por la expresión de HLA-DR, BDCA-2 y BDCA4, y de potenciales células precursoras de mastocitos ya que carece de la expresión de CD34¹⁴¹. Sin embargo, al utilizar el anti-FcεR dentro del cóctel para la exclusión de células linaje positivas, pudimos observar que no era posible identificar a la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ en SP; no obstante, al utilizar esta misma estrategia para analizar muestras de cordón umbilical (CU) se logró identificar a una población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}} \text{Fc}\epsilon\text{R}^-$; lo cual sugiere que la expresión de este receptor puede ser regulada durante las diferentes etapas de desarrollo de estas células. Adicionalmente la identificación de células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ tanto $\text{Fc}\epsilon\text{R}^+$ como $\text{Fc}\epsilon\text{R}^-$ en CU, sugiere al igual que trabajos previos¹⁰⁸, que la proporción de estas células es mayor en tejidos fetales y CU en comparación con muestras provenientes de tejidos adultos, probablemente debido a que la función de estas células es más importante durante las etapas tempranas de desarrollo o inclusive cuando los mecanismos de la respuesta inmune adaptativa se encuentran afectados como lo es el caso de alguna inmunodeficiencia; en futuros estudios será interesante comparar la capacidad funcional de estas células provenientes de CU contra lo observado con células de SP.

Cabe mencionar que la expresión del FcεR, es utilizada comúnmente para excluir a los basófilos del análisis de ILC. Sin embargo, se ha reportado que otras células como eosinófilos, monocitos, cDCs y pDCs también lo expresan¹⁴². De acuerdo a esto, la presencia de basófilos se evaluó por la expresión de diversos marcadores (FcεR, CD203c, CCR3, 2D7), así como por la morfología de las células $\text{Lin}^- \text{CD123}^{\text{low}} \text{CD127}^{\text{int}}$ presentes en SP. Los resultados mostraron que dentro de la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ existe una mezcla de células con morfología linfoide (núcleo no segmentado) y células con morfología clásica de basófilos (núcleo lobulado). Adicionalmente

fue posible clasificar a dos poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$: $\text{FSC}^{\text{int}} \text{SSC}^{\text{int}}$ y $\text{FSC}^{\text{low}} \text{SSC}^{\text{low}}$ con respecto a los parámetros de tamaño y granularidad relativos, la primera fue considerada como la población “clásica” de basófilos y la segunda como la población de estudio: $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$.

En este trabajo hemos encontrado que la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ ($\text{FSC}^{\text{low}} \text{SSC}^{\text{low}}$) comparte características fenotípicas con la población de basófilos ($\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{FSC}^{\text{int}} \text{SSC}^{\text{int}}$), entre ellas la expresión basal similar de $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ y CCR3 ; sin embargo, presenta una menor expresión de CD203c y del antígeno reconocido por el anticuerpo anti-2D7 (el cual se expresa en los gránulos de los basófilos)¹⁴³, adicionalmente expresa niveles basales bajos de marcadores asociados con células linfoides (CD7 y CD127). Interesantemente, después de la activación con PMA/Ionomicina estas diferencias fenotípicas se hicieron más evidentes, debido a que la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ ($\text{FSC}^{\text{low}} \text{SSC}^{\text{low}}$), disminuye la expresión de todos los marcadores asociados a basófilos, incluyendo CD123 , lo cual no sucede en la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ ($\text{FSC}^{\text{int}} \text{SSC}^{\text{int}}$), que también mantiene la expresión de $\text{Fc}\epsilon\text{R}$, CCR3 e inclusive incrementa la expresión de CD203c , este ha sido reportado como un marcador de activación, utilizado comúnmente durante los ensayos de activación de basófilos (BATs)¹⁴⁴. La disminución de la expresión de CD123 solo ha sido reportada por otro grupo de trabajo, en donde ha sido propuesto como un marcador alternativo de activación de basófilos en los BATs¹⁴⁵; no obstante, esta observación ha sido cuestionada ya que la mayoría de trabajos afirman que los basófilos, inclusive después de ser activados mantienen una expresión alta de CD123 ¹⁴⁶, esto sugiere que probablemente la disminución de CD123 reportada por este grupo, sea debida a la presencia de la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ que no ha sido considerada dentro del análisis.

Adicionalmente pudimos observar que la población que disminuye la expresión de CD123 en respuesta a la activación, es la que expresa las citocinas ($\text{IFN-}\gamma$, IL-2 , IL-4 e IL-8) y que la activación realizando el entrecruzamiento con IgE humana no indujo la producción de las mismas. La regulación de la activación de estas células mediada por IgE de acuerdo a la expresión mostrada del $\text{Fc}\epsilon\text{R}$, resulta un área interesante de investigación, ya que en otras células que también expresan este receptor, como las pDCs, se ha descrito que la activación por IgE bloquea la producción de interferones tipo I, en respuesta a CpG (Ligando de TLR9)¹⁴², el cual

ha sido propuesto como un mecanismo de regulación. Adicionalmente se ha descrito que la expresión del FcεR puede ser regulada por diversos factores, como IL-4 que puede inducir su expresión, o inclusive la IgE la cual puede mantener la expresión del mismo^{142,147}, sin embargo en este trabajo solo hemos observado la regulación de la expresión de este receptor en respuesta a la activación con PMA/Ionomicina.

De acuerdo a los resultados anteriores, en donde fue posible establecer que la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} posee características distintas a los basófilos clásicos; la evaluación de un amplio panel de marcadores descritos para distintas subpoblaciones de ILC, nos permitió confirmar que además de la expresión de CD7 y CD127, la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} de SP posee diversas características de ILC, entre las que destacan la expresión de ID2, la cual resultó ser similar en las ILC clásicas (Lin⁻ CD127⁺); la expresión de PLZF, TOX, TCF-1 y de manera importante NFIL3, además de diversos marcadores como CD132 (descrito como crucial para el desarrollo de ILC)¹⁴⁸, además de la expresión de c-Kit, CRTH2, AhR, IL23R entre otros.

Es importante mencionar que no obstante se ha determinado que la expresión de ID2 es fundamental en células precursoras de ILC^{8,9,114}; este represor transcripcional es expresado también por células dendríticas (cDCs, pDCs e inclusive células de Langerhans)¹⁰; y se ha descrito también que las células mieloides incrementan su expresión durante las diferentes etapas de diferenciación¹⁴⁹. De acuerdo a nuestras observaciones la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} presente en SP posee características mieloides y linfoides, además de expresar ID2, NFIL3 y diversos factores de transcripción como TOX, PZF y TCF-1, que pueden regular su posterior diferenciación y activación (T-bet y ROR-γt); lo cual desde nuestro punto de vista apoya la propuesta de que en humano la división entre linaje linfoide y mieloides no sigue un orden jerárquico tan estricto como se ha descrito en ratón. En trabajos posteriores será interesante analizar si existe algún precursor compartido entre ILC, pDCs, basófilos y la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}; diversas evidencias sugieren esta posibilidad: 1) TSLP la cual puede activar a los basófilos, señala también por el receptor de IL-7 expresado comúnmente en ILC, 2) la expresión de CD123 compartida entre basófilos, pDCs y la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}, sugiere una vía de diferenciación compartida, 3) la propuesta de que la IL-3 puede suplir la actividad de la IL-7 sobre precursores linfoides¹³¹, 4) la evidencia en donde se ha descrito que

IL-3 regula la actividad de NFIL3 sobre pro-linfocitos B^{137,138} y 5) que se ha demostrado que existen células como las pDCs que pueden originarse a partir tanto de precursores linfoides como mieloides, estas células son capaces de activar posteriormente programas génicos linfoides específicos relacionados con su principal función, que es la producción de interferones tipo I¹⁵⁰; esto sugiere que la regulación transcripcional probablemente sea más importante para completar el proceso de diferenciación de células de linajes específicos que la restricción de linaje previamente descrita de los CLPs o CMPs. Para poder analizar esta propuesta será necesario realizar análisis transcripcionales a nivel clonal, con el objetivo de establecer si existe un precursor común para estas células, o si la similitud de características fenotípicas observadas es debido al fenómeno de promiscuidad entre progenitores linfoides y mieloides propuesto anteriormente¹⁵¹, en donde por ejemplo, se ha demostrado que la señalización por el receptor de IL-2 (IL-2R) puede redirigir la diferenciación de CLPs hacia células con características mieloides¹⁵².

Al evaluar la actividad de la IL-3 sobre la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} de SP, pudimos confirmar que esta citocina es capaz de mantener la sobrevivencia de estas células, debido probablemente a que se encuentra inhibiendo el proceso de apoptosis al igual que se ha reportado en otras estirpes celulares¹³⁷⁻¹³⁹. Adicionalmente la IL-3 es capaz de inducir la expresión de NFIL3, PLZF y TOX, lo cual no sucede en las ILC clásicas inclusive en respuesta a IL-7; esto sugiere que es un factor importante en el desarrollo y diferenciación de estas células; en las cuales puede inducir características de ILC. Sin embargo, es necesario mencionar que esta regulación únicamente fue analizada a las 18 horas, por lo que en estudios posteriores será importante evaluar si la expresión de estos factores de transcripción puede realmente inducir la posterior diferenciación de estas células. Además del papel de la IL-3 en el proceso de diferenciación, existen otros factores adicionales que en un futuro será interesante evaluar; uno de ellos es TSLP, la cual se sabe que es importante durante el desarrollo de linfocitos T¹⁵³, pero que adicionalmente está involucrada en la activación de células mieloides (incluidos los basófilos)¹²⁷, y que inclusive es un estímulo de maduración de células dendríticas^{154,155}. A pesar de que se sabe que TSLP señala por el receptor de IL-7 (CD127), únicamente se ha evaluado su función como estímulo de activación en ILC2⁷⁵, sin embargo su papel durante etapas tempranas de diferenciación de ILC no ha sido determinado y de manera interesante se ha descrito que ratones deficientes de CD127 (IL-7R α) presentan deficiencias más severas de las

poblaciones de ILC2 e ILC3 en comparación con los ratones que son deficientes únicamente de IL-7; esto probablemente por la señalización debida a TSLP¹⁵⁶, la cual puede suplir la actividad de IL-7.

Posteriormente, al evaluar la expresión de marcadores utilizados para identificar las diferentes subpoblaciones de ILC (CD161, c-Kit, CRTH2 y NKp44), pudimos observar que la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} en SP, presenta un fenotipo al que podemos denominar como híbrido ya que de acuerdo a la expresión de CRTH2, la mayoría de la población puede ser clasificada como ILC2; sin embargo, al expresar T-bet y ROR γ t puede ser asociada también con el fenotipo de ILC1 e ILC3 respectivamente. Cabe mencionar que también se detectó una baja expresión de GATA-3; sin embargo, resulta interesante analizar adicionalmente en esta población, la expresión de los factores GATA-1 y GATA-2 los cuales se han asociado a la activación de NFIL3 regulada por IL-3¹³⁵. Dentro de la población Lin⁻ CD127⁺, fue posible identificar a las tres subpoblaciones de ILC, lo que corresponde también con la expresión de los factores T-bet, GATA-3 y ROR γ t; no obstante, en ninguno de los casos se observó la presencia de ILC3 NKp44⁺.

Por otra parte, al analizar la expresión de citocinas en respuesta a la activación encontramos que únicamente el cóctel de ILC1 (IL-3, IL-7, IL-12 e IL-15), indujo la expresión de IFN- γ tanto en la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} como en las ILC clásicas; y que la activación con PMA/Ionomicina indujo adicionalmente la expresión de IL-2, IL-4 e IL-8 en ambas poblaciones; sin embargo es necesario mencionar que los ensayos anteriores se realizaron a partir de CMSP totales y que cuando se confirmó la expresión de citocinas a partir de células aisladas por citometría de flujo, solo fue posible detectar IL-4 e IL-8 en la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}, (la población Lin⁻ CD127⁺ no fue analizada debido al limitado número de células).

En conjunto estos resultados sugieren que a pesar de que las poblaciones identificadas en SP, expresan distintos marcadores asociados a diferentes subpoblaciones de ILC, requieren de una señal adicional de activación para producir las citocinas características de estas células. Una posibilidad de acuerdo a lo observado con respecto a CMSP y células aisladas, es que su activación requiere de la interacción con otras estirpes celulares o de algún otro factor derivado

de ellas. Recientemente en humano se ha reportado, que las subpoblaciones de ILC2 e ILC3 pueden activarse por IL-18, para la producción de IL-8 y GM-CSF⁵⁹; de acuerdo a la expresión de IL-8 en ambas poblaciones Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺ de SP, resulta interesante analizar la expresión del receptor de esta citocina y evaluar su posterior activación. Es importante mencionar que la expresión de IL-8 por ILC solo ha sido reportada en un par de trabajos previos^{59,75,90}, y es un área interesante de investigación ya que la producción de IL-8 probablemente sea un mecanismo mediante el cual las ILC pueden reclutar a otras células del sistema inmune innato como neutrófilos o monocitos y de esta manera sean capaces de mantener señales de retroalimentación para su activación e inclusive inducir en conjunto mecanismos de migración a distintos tejidos. Es importante mencionar que en futuros estudios es necesario diseñar una estrategia para poder aislar a la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} de los basófilos “clásicos” para poder evaluar el perfil transcripcional completo de esta población y así identificar posibles receptores que puedan mediar su diferenciación y activación.

Por otra parte, este año un estudio en donde se ha analizado la diversidad de subpoblaciones de ILC en humano provenientes de distintas muestras patológicas y no patológicas, ha cuestionado la existencia de ILC1 de tipo cooperador como una subpoblación distinta a las NKs, debido a que ambas poblaciones comparten la expresión de múltiples marcadores, lo cual no permite hacer una distinción clara entre estas dos poblaciones⁵⁹. De acuerdo a nuestros resultados, en donde determinamos que la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} expresa T-bet y es capaz de producir IFN- γ en respuesta al cóctel de activación, proponemos que dicha población presenta características de ILC1 en SP, y a diferencia de la población Lin⁻ CD127⁺ (que también produce IFN- γ), claramente puede ser distinguida de las células NK e ILC1 “clásicas”, de acuerdo a la expresión de CD123; esto sugiere que en SP la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} es una fuente alterna de células con características de ILC1.

Durante varios años se ha propuesto que las ILC presentes en SP, se encuentran en un estado inmaduro, o que inclusive se encuentran en un etapa intermedia de diferenciación, por lo que se les ha considerado como células precursoras (ILCPs) que necesitan migrar a diferentes órganos blanco para completar su diferenciación en respuesta a estímulos locales⁷; esta propuesta ha sido confirmada este año por un grupo de investigación en donde se ha encontrado que la población

identificada como Lin⁻, CD7⁺, CD127⁺, c-Kit⁺, puede dar origen a las diferentes subpoblaciones de ILC y que requiere de IL-2, IL-7 e IL-1 β para su diferenciación. Sin embargo, se ha observado que esta población en estado basal a pesar de presentar un fenotipo similar al de las ILC3, no es capaz de producir IL-17 e IL-22 después de ser estimulada⁶. De acuerdo a nuestros resultados las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺ de SP (ambas ROR γ t⁺ e IL-23R⁺) no produjeron IL-17 ni IL-22 en respuesta al cóctel de ILC3 (IL-3, IL-7, IL-1 β , IL-2 e IL-23); esto puede ser debido a diversas causas: 1) porque se encuentran en un estado inmaduro y requieran de mayor tiempo de activación al que establecimos en los experimentos, 2) ambas poblaciones al presentar una alta expresión basal del AhR son susceptibles de ser reguladas por distintos ligandos de este receptor presentes en sangre, los cuales se ha descrito pueden modular la producción de citocinas¹⁵⁷ y 3) porque probablemente estas células necesiten señales adicionales de diferenciación del tejido blanco al cual migren.

Posteriormente al analizar la expresión de distintos marcadores asociados con el potencial de migración a tejidos (CLA, CXCR4, CD62L y CCR6), se determinó que las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} y Lin⁻ CD127⁺ de SP poseen una expresión diferencial de los mismos. De manera notable observamos que la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} posee una alta expresión de CLA, CXCR4 y CD62L en comparación con la población Lin⁻ CD127⁺, la cual únicamente mostró una mayor expresión de CCR6. Estos resultados nos sugirieron que ambas poblaciones presentes en SP, tienen la capacidad de movilizarse a tejidos periféricos. Previamente se ha descrito que la expresión de CLA en ILC2 e ILC3 permite identificar a células con potencial de migración a piel^{67,110}; por lo cual de acuerdo a la alta expresión de CLA en la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}, la piel representa uno de los tejidos blancos más importantes a donde pueden migrar estas células. Sin embargo, la expresión de CD62L, CXCR4 y CCR6 sugiere adicionalmente que poseen la capacidad de migrar a otros órganos como nódulos linfáticos e intestino¹⁵⁸.

Al analizar las muestras provenientes de la dermis de piel de individuos sanos, fue posible identificar dos poblaciones equivalentes a las presentes en SP. La población Lin⁻ CD123⁺ en piel también posee diversas características compartidas de ILC (CD132, CD90, c-Kit, CRTH2, AhR, IL-23R, NKp44), y a diferencia de la población de SP, posee una expresión intermedia de

CD127, no expresa ningún marcador de basófilos (FcεR, CCR3, CD203c, 2D7) y presenta una mayor diversidad fenotípica, ya que fue posible identificar a las subpoblaciones de ILC1, ILC2 e ILC3 (NKp44⁻ y NKp44⁺).

Consistentemente con la mayor diversidad fenotípica observada en piel, fue posible determinar que la población Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} expresa IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-8 en respuesta a la activación con PMA/Ionomicina; pero que adicionalmente expresa IL-17 e IL-22, lo cual probablemente está asociado con la alta expresión del AhR y el receptor de IL-23 observada en esta población ¹⁰⁰. En cambio, la población Lin⁻ CD127⁺ únicamente expresó IFN-γ, IL-2, IL-8 y muy poca IL-17. Interesantemente la mayor expresión de IL-17 e IL-22 en la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{int} fue detectada en respuesta al estímulo de PMA/Ionomicina en conjunto con el cóctel de activación de ILC3 (IL-3, IL-7, IL-1β, IL-2 e IL-23).

Los resultados anteriores sugieren que en tejidos periféricos (como la piel) la población Lin⁻ CD123^{low}CD127^{int} presenta una mayor diversidad fenotípica y una mayor capacidad de producción de citocinas, al igual que ha sido reportado para otras subpoblaciones de ILC^{159,160}. Sin embargo, es necesario mencionar que debido al limitado número de células obtenidas de la piel, la expresión de citocinas no fue evaluada en las poblaciones aisladas; por lo cual es posible que otras células presentes en piel contribuyan a la activación de la población Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} al igual que ha sido reportado para otras subpoblaciones de ILC¹⁶¹. Adicionalmente, de manera similar a SP; la población Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} en piel presenta una mayor frecuencia que la población Lin⁻ CD127⁺; de acuerdo a la alta expresión de CLA es posible que la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} de SP posea una mayor capacidad de migración a piel en condiciones homeostáticas, al igual que ha sido reportado para linfocitos T¹⁶².

En resumen, nuestras observaciones indican que el uso de los anticuerpos anti-FcεR y anti-CD123 para la exclusión de células “linaje positivas” en el análisis de ILC en reportes anteriores, posiblemente han limitado la identificación de células con características de ILC en diversos tejidos. De acuerdo al fenotipo observado, fue posible realizar la identificación de la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} en SP y de una población con características fenotípicas similares Lin⁻

CD123^{low} CD127^{int} en piel, que en principio se distinguen por la expresión diferencial de CD123 y CD127.

Los resultados obtenidos sugieren que estas poblaciones se encuentran en distintas etapas de diferenciación, siendo la población de piel la que posee una mayor capacidad de respuesta a estímulos. En la figura 16 se hace una comparación de las características fenotípicas y funcionales de las poblaciones identificadas en SP y piel de individuos sanos.

En estudios posteriores será importante dilucidar los diferentes mecanismos de activación de estas células; una propuesta interesante es la vía de JAK-STAT, ya que de acuerdo a la expresión de la cadena gamma común (CD132) descrita en las ILC y en la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}, la transducción de señales mediada por citocinas depende de JAK1 y JAK3. A diferencia de los linfocitos T, en donde la activación de diferentes STATs se ha asociado con la polarización de poblaciones: STAT4 con Th1, STAT6 con Th2 y STAT3 con Th17¹⁶³; en ILC, la activación de diversas STATs no se requiere durante el proceso de diversificación, pero es importante para la activación de las mismas; se ha observado que la deficiencia de STAT4 afecta la función de NKs e ILC1 durante infecciones, la deficiencia de STAT6 en ILC2, se refleja en una menor producción de IL-13, mientras que STAT3 regula la producción de IL-22 en ILC3. Debido a esto se ha propuesto que el uso de inhibidores específicos de JAKs, en futuros trabajos permitirá modular la respuesta de diferentes subpoblaciones de ILC¹⁵⁶.

Otro mecanismo de activación interesante de evaluar con gran potencial terapéutico, es el mediado por ligandos del AhR, ya que como se ha mencionado, tanto las células de SP como las de piel poseen una alta expresión de este FT ligando dependiente, y que de acuerdo a su localización son susceptibles a estar en contacto con una gran variedad de ligandos, los cuales pueden modular la producción de IL-17 e IL-22.

Finalmente, a pesar de que recientemente se ha especulado mucho acerca de la redundancia funcional de las ILC y los linfocitos T dentro de la respuesta inmune en el humano^{108,164}; actualmente existe un creciente número de trabajos en donde se ha demostrado la importancia funcional de las ILC y adicionalmente se han identificado nuevas poblaciones celulares con características de ILC, como la identificada en este trabajo (Lin⁻ CD123⁺ CD127^{int}), la cual

comparte características linfoides y mieloides en SP, lo cual sugiere que el proceso de diferenciación en humano es más flexible que lo establecido en ratón. Por otra parte, se ha propuesto que la falla en la recuperación de las poblaciones de ILC en SP y tejidos de pacientes con SCID que recibieron el trasplante de CTH, se debe a que los nichos hematopoyéticos son ocupados por células mieloides¹⁰⁸; de acuerdo a nuestros datos la población Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} al compartir características mieloides, probablemente se encuentre intacta en estos pacientes, en los cuales su función no ha sido evaluada debido a la exclusión de células CD123⁺ de los análisis de ILC.

Adicionalmente los últimos estudios hechos en cáncer han identificado poblaciones de ILC y poblaciones con características de ILC, las cuales pueden presentar funciones duales durante el desarrollo de tumores^{101,165}; en uno de los trabajos más recientes, se ha identificado una población CD3⁻,CD56^{hi}, CD16⁻, CD94⁺, NKG2D⁺ KIR⁺, NKp30⁺, NKp46⁺, ID2⁺,CD7⁺; la cual de acuerdo al fenotipo observado no puede ser clasificada dentro de ninguna de las subpoblaciones de ILC descritas, pero comparte la expresión de diversos marcadores asociados a células NK, y marcadores clásicos de ILC como ID2 y CD7. Esta población se encuentra infiltrando tumores de cáncer de ovario y ha mostrado poseer funciones supresoras sobre los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ infiltrantes de tumor (TILs)¹⁶⁶. Estos nuevos hallazgos apoyan la idea de que en humano la heterogeneidad de poblaciones de ILC entre tejidos y entre individuos es aún mayor que lo reportado en ratón, por lo que probablemente sus capacidades funcionales como moduladoras de la respuesta inmune sean aún más complejas que lo establecido hasta el momento.

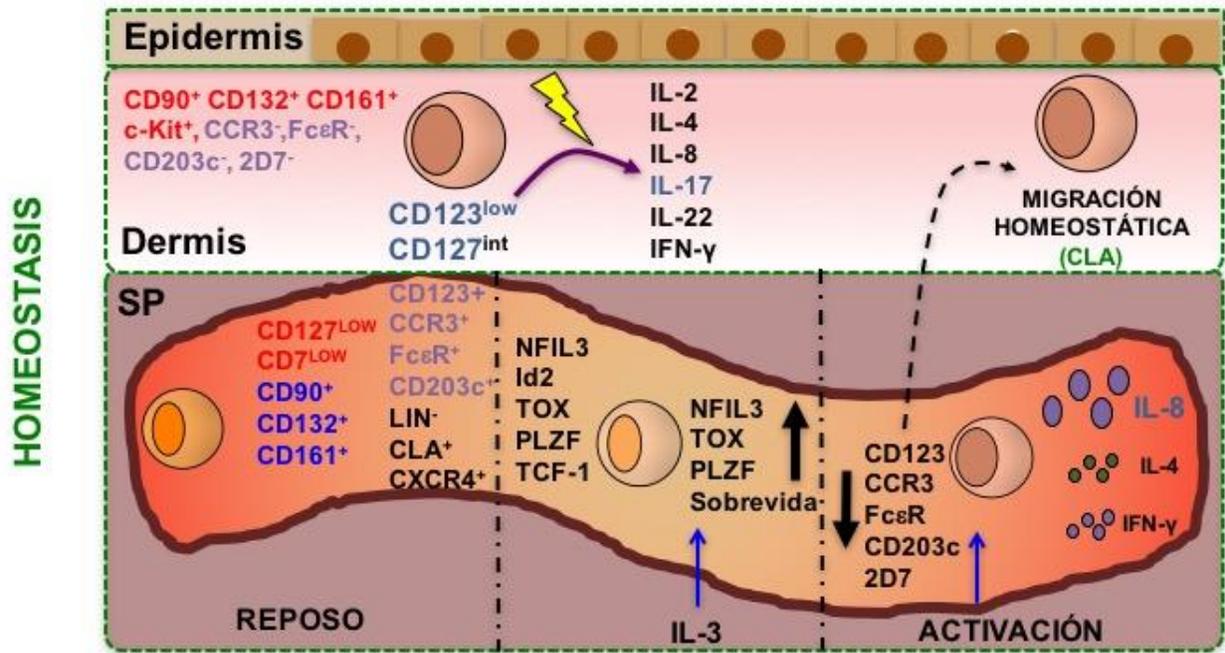


Figura 16. La población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ presente en SP y piel de individuos sanos posee características de ILC.

En sangre periférica (SP) se encuentra una población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ la cual presenta una expresión mixta de marcadores linfoides (rojo: CD7, CD127) y de marcadores de basófilos (morado: FcεR, CCR3, CD203, 2D7), adicionalmente expresa moléculas que participan en el reclutamiento a piel como CLA, la cual estaría mediando la migración homeostática de estas células a piel. En condiciones de homeostasis, la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^{\text{low}}$ posee diversas características de ILC (azul: Lin^- , CD132, CD90, CD161, NFIL3, TCF-1, Id2, TOX, PLZF). La activación con IL-3 mantiene la sobrevivencia de estas células e incrementa la expresión de factores de transcripción de ILC. Por otra parte, la activación con PMA/Ionicina en esta población, induce la desregulación de la expresión de CD123 y los demás marcadores de basófilos. Adicionalmente en respuesta a la activación es capaz de producir las citocinas: IL-8, IL-4, IL-2 e IFN- γ . En la dermis de individuos sanos, se encuentra presente una población $\text{Lin}^- \text{CD123}^{\text{low}} \text{CD127}^{\text{int}}$ con características semejantes a la identificada en SP, que no expresa marcadores de basófilos y que en respuesta a la activación con PMA/Ionicina es capaz de producir adicionalmente IL-17 e IL-22.

8. CONCLUSIONES.

En este trabajo se ha identificado en SP una población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ con características mieloides y linfoides la cual comparte diversas propiedades fenotípicas con las ILC ($\text{ID2}^+ \text{NFIL3}^+ \text{PLZF}^+ \text{TOX}^+ \text{TCF-1}^+ \text{CD132}^+ \text{CD90}^+ \text{CD161}^+ \text{integrina } \alpha 4^+ \text{c-Kit}^+ \text{CRTH2}^+ \text{AhR}^+ \text{IL-23R}^+$). De acuerdo a la expresión de CD123 en estas células, hemos determinado que la IL-3 puede regular la expresión de factores de transcripción como NFIL3, TOX y PLZF, asociados con la inducción de un fenotipo de ILC y que además es un factor de supervivencia para las células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$. Adicionalmente hemos establecido diferencias morfológicas y fenotípicas entre la población clásica de basófilos y la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$.

Nuestros resultados sugieren que la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ en SP la cual posee un fenotipo híbrido entre ILC1-ILC2 e ILC3, representa un reservorio de células en reposo, que en condiciones homeostáticas poseen el potencial de migrar a piel mediado por CLA, en donde pueden ser posteriormente activadas por estímulos locales.

La identificación en piel de una población $\text{Lin}^- \text{CD123}^{\text{low}} \text{CD127}^{\text{int}}$ con características similares a la de SP, confirma que este tejido se encuentra normalmente infiltrado por células $\text{Lin}^- \text{CD123}^{\text{low}} \text{CD127}^{\text{int}}$ con características fenotípicas compartidas con las ILC, y que a diferencia de SP se encuentran en una etapa distinta de diferenciación de acuerdo a la capacidad de respuesta a estímulos que se observó.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Obaldia, M. E. De & Bhandoola, A. Transcriptional Regulation of Innate and Adaptive Lymphocyte Lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 607–642 (2015). doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112032
2. Juelke, K. & Romagnani, C. Differentiation of human innate lymphoid cells (ILCs). *Curr. Opin. Immunol.* **38**, 75–85 (2016).
3. Gronke, K., Kofoed-Nielsen, M. & Diefenbach, A. Innate lymphoid cells, precursors and plasticity. *Immunol. Lett.* **179**, 9–18 (2016).
4. Yang, Q. *et al.* TCF-1 upregulation identifies early innate lymphoid progenitors in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **16**, 1044–1050 (2015).
5. Gronke, K., Nielsen, M. K. & Diefenbach, A. Innate lymphoid cells, precursors and plasticity. (2016). doi:10.1016/j.imlet.2016.07.004
6. Lim, A. I. *et al.* Systemic Human ILC Precursors Provide a Substrate for Tissue ILC Differentiation. *Cell* **168**, 1086–1100.e10 (2017).
7. Serafini, N., Vosshenrich, C. a. J. & Di Santo, J. P. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 415–428 (2015).
8. Constantinides, M. G., McDonald, B. D., Verhoef, P. a & Bendelac, A. A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature* **508**, 397–401 (2014).
9. Verykokakis, M., Zook, E. C. & Kee, B. L. ID'ing innate and innate-like lymphoid cells. *Immunol. Rev.* **261**, 177–97 (2014).
10. Hacker, C. *et al.* Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol* **4**, 380–386 (2003).
11. Nakahiro, T., Kurooka, H., Mori, K., Sano, K. & Yokota, Y. Identification of BMP-responsive elements in the mouse Id2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 416–21 (2010).
12. Klose, C. S. N. *et al.* Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* **157**, 340–356 (2014).
13. Constantinides, M. G. & Bendelac, A. Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 161–7 (2013).
14. Zhang, W. E. I. *et al.* Molecular Cloning and Characterization of NF-IL3A , a Transcriptional Activator of the Human Interleukin-3 Promoter. **15**, 6055–6063 (1995).
15. Kashiwada, M. *et al.* IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 821–826 (2010).
16. Ikushima, S. *et al.* Pivotal role for the NFIL3/E4BP4 transcription factor in interleukin 3-mediated survival of pro-B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2609–2614 (1997).
17. Kashiwada, M. *et al.* NFIL3 / E4BP4 is a key transcription factor for CD8a+ dendritic cell development. *Blood* **117**, 6193–6197 (2011).
18. Kobayashi, T. *et al.* NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity. *J. Immunol.* **186**, 4649–4655 (2011).
19. Yu, X. *et al.* TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science* **342**, 727–30 (2013).
20. Seillet, C. *et al.* Nfil3 is required for the development of all innate lymphoid cell subsets. *J. Exp. Med.* **211**, 1733–40 (2014).
21. Geiger, T. L. *et al.* Nfil3 is crucial for development of innate lymphoid cells and host

- protection against intestinal pathogens. *J. Exp. Med.* **211**, 1723–1731 (2014).
22. Yu, X. *et al.* The basic leucine zipper transcription factor NFIL3 directs the development of a common innate lymphoid cell precursor. *Elife* **3**, 1–20 (2014).
 23. Xu, W. *et al.* NFIL3 Orchestrates the Emergence of Common Helper Innate Lymphoid Cell Precursors. *Cell Rep.* **10**, 2043–2054 (2015).
 24. Wilkinson, B. *et al.* TOX: an HMG box protein implicated in the regulation of thymocyte selection. *Nat. Immunol.* **3**, 272–280 (2002).
 25. Zhong, C. & Zhu, J. Transcriptional Regulatory Network for the Development of Innate Lymphoid Cells. **2015**, (2015).
 26. Aliahmad, P., de la Torre, B. & Kaye, J. Shared dependence on the DNA-binding factor TOX for the development of lymphoid tissue-inducer cell and NK cell lineages. *Nat. Immunol.* **11**, 945–52 (2010).
 27. Seehus, C. R. *et al.* The development of innate lymphoid cells requires TOX-dependent generation of a common innate lymphoid cell progenitor. *Nat. Immunol.* **16**, (2015).
 28. Spits, H. TOX sets the stage for innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **16**, 594–595 (2015).
 29. Tindemans, I., Serafini, N., Di Santo, J. P. & Hendriks, R. W. GATA-3 Function in Innate and Adaptive Immunity. *Immunity* **41**, 191–206 (2014).
 30. Hoyler, T. *et al.* The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* **37**, 634–48 (2012).
 31. Furusawa, J. *et al.* Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function. *J. Immunol.* **191**, 1818–26 (2013).
 32. Tanriver, Y. & Diefenbach, A. Transcription factors controlling development and function of innate lymphoid cells. *Int. Immunol.* **26**, 119–28 (2014).
 33. Yagi, R. *et al.* The transcription factor GATA3 is critical for the development of all IL-7R α -expressing innate lymphoid cells. *Immunity* **40**, 378–388 (2014).
 34. Serafini, N. *et al.* Gata3 drives development of ROR γ t+ group 3 innate lymphoid cells. *J. Exp. Med.* **211**, 199–208 (2014).
 35. Diefenbach, A., Colonna, M. & Koyasu, S. Development, Differentiation, and Diversity of Innate Lymphoid Cells. *Immunity* **41**, 354–365 (2014).
 36. Samson, S. I. *et al.* GATA-3 promotes maturation, IFN- γ production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* **19**, 701–711 (2003).
 37. Weber, B. N. *et al.* A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature* **476**, 63–68 (2011).
 38. Mielke, L. *a et al.* TCF-1 controls ILC2 and NKp46+ROR γ t+ innate lymphocyte differentiation and protection in intestinal inflammation. *J. Immunol.* **191**, 4383–91 (2013).
 39. Ioannidis, V., Kunz, B., Tanamachi, D. M., Scarpellino, L. & Held, W. Initiation and limitation of Ly-49A NK cell receptor acquisition by T cell factor-1. *J Immunol* **171**, 769–775 (2003).
 40. Kaye, J. ILC development : TCF-1 reporting in. *Nature* **16**, 4–5 (2015).
 41. Seillet, C. *et al.* Deciphering the Innate Lymphoid Cell Transcriptional Program. *Cell Rep.* **17**, 436–447 (2016).
 42. De Obaldia, M. E. & Bhandoola, A. Transcriptional Regulation of Innate and Adaptive Lymphocyte Lineages. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 607–642 (2015).
 43. Li, P. *et al.* Reprogramming of T Cells to Natural Killer-Like Cells upon Bcl11b Deletion. *Science (80-.).* **329**, 85–89 (2010).
 44. Walker, J. a. *et al.* Bcl11b is essential for group 2 innate lymphoid cell development. *J. Exp. Med.* **212**, 875–882 (2015).

45. Yu, Y. *et al.* The transcription factor Bcl11b is specifically expressed in group 2 innate lymphoid cells and is essential for their development. *J. Exp. Med.* **212**, 865–874 (2015).
46. Diseases, I., Zhong, C., Zhu, J. & Diseases, I. Bcl11b drives the birth of ILC2 innate lymphocytes. 828–831 (2015).
47. Ebihara, T. *et al.* Runx3 specifies lineage commitment of innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* 1–11 (2015). doi:10.1038/ni.3272
48. Cherrier, M., Sawa, S. & Eberl, G. Notch, Id2, and ROR γ t sequentially orchestrate the fetal development of lymphoid tissue inducer cells. *J. Exp. Med.* **209**, 729–40 (2012).
49. Yang, Q. *et al.* T cell factor 1 is required for group 2 innate lymphoid cell generation. *Immunity* **38**, 694–704 (2013).
50. Wong, S. H. *et al.* Transcription factor ROR α is critical for nuocyte development. *Nat. Immunol.* **13**, 229–236 (2012).
51. Possot, C. *et al.* Notch signaling is necessary for adult, but not fetal, development of ROR γ t⁺ innate lymphoid cells. *Nature Immunology* **12**, 949–958 (2011).
52. Rankin, L. C. *et al.* The transcription factor T-bet is essential for the development of NKp46⁺ innate lymphocytes via the Notch pathway. *Nat. Immunol.* **14**, 389–95 (2013).
53. Sciumé, G. *et al.* Distinct requirements for T-bet in gut innate lymphoid cells. *J. Exp. Med.* **209**, 2331–8 (2012).
54. Lee, J. S. *et al.* AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nature Immunology* **13**, 144–151 (2011).
55. Montaldo, E. *et al.* Human innate lymphoid cells. *Immunol. Lett.* **179**, 2–8 (2016).
56. Satoh-Takayama, N. *et al.* The natural cytotoxicity receptor NKp46 is dispensable for IL-22-mediated innate intestinal immune defense against *Citrobacter rodentium*. *J. Immunol.* **183**, 6579–6587 (2009).
57. Vonarbourg, C. *et al.* Regulated expression of nuclear receptor ROR γ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR γ t⁺ innate lymphocytes. *Immunity* **33**, 736–751 (2010).
58. Klose, C. S. N. *et al.* A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR γ t⁺ innate lymphoid cells. *Nature* **494**, 261–265 (2013).
59. Simoni, Y. *et al.* Human Innate Lymphoid Cell Subsets Possess Tissue-Type Based Heterogeneity in Phenotype and Frequency. *Immunity* **46**, 148–161 (2016).
60. Bernink, J. H. *et al.* Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat. Immunol.* **14**, 221–9 (2013).
61. Marquardt, N. *et al.* Cutting Edge: Identification and Characterization of Human Intrahepatic CD49a⁺ NK Cells. *J. Immunol.* 0–2 (2015). doi:10.4049/jimmunol.1402756
62. Moro, K. *et al.* Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* **463**, 540–544 (2010).
63. Price, A. E. *et al.* Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11489–11494 (2010).
64. Neill, D. R. *et al.* Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* **464**, 1367–1370 (2010).
65. Doherty, T. a. At the Bench: Understanding group 2 innate lymphoid cells in disease. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 1–13 (2014).
66. Mjösberg, J. M. *et al.* Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat. Immunol.* **12**, 1055–62 (2011).
67. Teunissen, M. B. M. *et al.* Composition of innate lymphoid cell subsets in the human skin:

- enrichment of NCR(+) ILC3 in lesional skin and blood of psoriasis patients. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2351–60 (2014).
68. Dyring-Andersen, B. *et al.* Increased number and frequency of group 3 innate lymphoid cells in nonlesional psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* **170**, 609–16 (2014).
 69. Brestoff, J. R. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* **519**, 242–6 (2015).
 70. Halim, T. Y. F. Group 2 innate lymphoid cells in disease. *Int. Immunol.* **28**, 13–22 (2015).
 71. Tait Wojno, E. D. *et al.* The prostaglandin D2 receptor CRTH2 regulates accumulation of group 2 innate lymphoid cells in the inflamed lung. *Mucosal Immunol.* **8**, 1–11 (2015).
 72. Xue, L. *et al.* Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol* **133**, 1184–1194 (2014).
 73. Salimi, M. *et al.* Group 2 Innate Lymphoid Cells Express Functional NKp30 Receptor Inducing Type 2 Cytokine Production. *J. Immunol.* 1501102 (2015). doi:10.4049/jimmunol.1501102
 74. Halim, T. Y. F. *et al.* Retinoic-Acid-Receptor-Related Orphan Nuclear Receptor Alpha Is Required for Natural Helper Cell Development and Allergic Inflammation. *Immunity* **37**, 463–474 (2012).
 75. Mjösberg, J. *et al.* The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* **37**, 649–59 (2012).
 76. Buonocore, S. *et al.* Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* **464**, 1371–5 (2010).
 77. Crellin, N. K., Trifari, S., Kaplan, C. D., Cupedo, T. & Spits, H. Human NKp44+IL-22+ cells and LTi-like cells constitute a stable RORC+ lineage distinct from conventional natural killer cells. *J. Exp. Med.* **207**, 281–90 (2010).
 78. Finke, D. Fate and function of lymphoid tissue inducer cells. *Current Opinion in Immunology* **17**, 144–150 (2005).
 79. Cupedo, T. *et al.* Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat. Immunol.* **10**, 66–74 (2009).
 80. Hoorweg, K. *et al.* A Stromal Cell Niche for Human and Mouse Type 3 Innate Lymphoid Cells. *J. Immunol.* **195**, 4257–63 (2015).
 81. Scandella, E. *et al.* Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue–inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nat. Immunol.* **9**, 667–675 (2008).
 82. Liang, S. C. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* **203**, 2271–2279 (2006).
 83. Zheng, Y. *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* **14**, 282–289 (2008).
 84. Hughes, T. *et al.* Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue. *Immunity* **32**, 803–14 (2010).
 85. Crellin, N. K. *et al.* Regulation of cytokine secretion in human CD127(+) LTi-like innate lymphoid cells by Toll-like receptor 2. *Immunity* **33**, 752–64 (2010).
 86. Cella, M. *et al.* A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* **457**, 722–5 (2009).
 87. Spits, H. *et al.* Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev.*

- Immunol.* **13**, 145–9 (2013).
88. Glatzer, T. *et al.* ROR γ t⁺ innate lymphoid cells acquire a proinflammatory program upon engagement of the activating receptor NKp44. *Immunity* **38**, 1223–35 (2013).
 89. Cella, M., Otero, K. & Colonna, M. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1beta reveals intrinsic functional plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10961–6 (2010).
 90. Croxatto, D. *et al.* Group 3 innate lymphoid cells regulate neutrophil migration and function in human decidua. *Mucosal Immunol.* 1–12 (2016). doi:10.1038/mi.2016.10
 91. Villanova, F. *et al.* Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 984–91 (2014).
 92. Magri, G. *et al.* Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat. Immunol.* **15**, 354–364 (2014).
 93. Doisne, J.-M. *et al.* Composition, Development, and Function of Uterine Innate Lymphoid Cells. *J. Immunol.* **195**, 3937–3945 (2015).
 94. Carrega, P. *et al.* NCR+ILC3 concentrate in human lung cancer and associate with intratumoral lymphoid structures. *Nat. Commun.* **6**, 8280 (2015).
 95. Vonarbourg, C. & Diefenbach, A. Multifaceted roles of interleukin-7 signaling for the development and function of innate lymphoid cells. *Semin. Immunol.* **24**, 165–74 (2012).
 96. Mjösberg, J. M. *et al.* Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat. Immunol.* **12**, 1055–1062 (2011).
 97. Qiu, J. *et al.* The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells. *Immunity* **36**, 92–104 (2012).
 98. Kiss, E. A. *et al.* Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Control Organogenesis of Intestinal Lymphoid Follicles. *Science* **334**, 1561–1565 (2011).
 99. Connor, K. T. *et al.* AH receptor agonist activity in human blood measured with a cell-based bioassay: evidence for naturally occurring AH receptor ligands in vivo. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **18**, 369–380 (2008).
 100. DiMeglio, P. *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity* **40**, 989–1001 (2014).
 101. Dadi, S. *et al.* Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell* **164**, 365–377 (2016).
 102. Zhu, J., Jankovic, D., Grinberg, A., Guo, L. & Paul, W. E. Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18214–18219 (2006).
 103. Zhu, J. *et al.* Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF-beta is important for differentiation of Th17 and CD103+ inducible regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 329–41 (2009).
 104. Spooner, C. J. *et al.* Specification of type 2 innate lymphocytes by the transcriptional determinant Gfi1. *Nat. Immunol.* **14**, 1229–36 (2013).
 105. Vonarbourg, C. *et al.* Regulated expression of nuclear receptor RORgammat confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing RORgammat(+) innate lymphocytes. *Immunity* **33**, 736–751 (2010).
 106. Diefenbach, A., Colonna, M. & Romagnani, C. The ILC World Revisited. in *Immunity* **46**, 327–332 (2017).
 107. Vivier, E., Pavert, S. A. van de, Cooper, M. D. & Belz, G. T. The evolution of innate

- lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **17**, 790–794 (2016).
108. Vély, F. *et al.* Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nat. Immunol.* **17**, 1291–1299 (2016).
 109. Cols, M. *et al.* Expansion of inflammatory innate lymphoid cells in patients with common variable immune deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**, 1206–1215.e6 (2015).
 110. Munneke, J. & Björklund, A. Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft versus host disease. *Blood* **124**, 812–821 (2014).
 111. Nish, S. & Medzhitov, R. Host defense pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. *Immunity* **34**, 629–36 (2011).
 112. Klöverpris, H. N. *et al.* Innate Lymphoid Cells Are Depleted Irreversibly during Acute HIV-Infection in the Absence of Viral Suppression. *Immunity* **44**, 391–405 (2016).
 113. Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell* **91**, 661–672 (1997).
 114. Klose, C. S. N. *et al.* Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* **157**, 340–56 (2014).
 115. Yoshida, H. *et al.* Different cytokines induce surface lymphotoxin- $\alpha\beta$ on IL-7 receptor- α cells that differentially engender lymph nodes and Peyer’s patches. *Immunity* **17**, 823–833 (2002).
 116. Satoh-Takayama, N. *et al.* IL-7 and IL-15 independently program the differentiation of intestinal CD3⁻ NKp46⁺ cell subsets from Id2-dependent precursors. *J. Exp. Med.* **207**, 273–280 (2010).
 117. Schmutz, S. *et al.* Cutting edge: IL-7 regulates the peripheral pool of adult ROR gamma+ lymphoid tissue inducer cells. *J. Immunol.* **183**, 2217–21 (2009).
 118. Seillet, C., Belz, G. T. & Mielke, L. A. Complexity of cytokine network regulation of innate lymphoid cells in protective immunity. *Cytokine* (2014). doi:10.1016/j.cyto.2014.06.002
 119. Xu, W. *et al.* NFIL3 orchestrates the emergence of common helper innate lymphoid cell precursors. *Cell Rep.* **10**, 2043–2054 (2015).
 120. Honda, K. *et al.* Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer’s patch organogenesis. *J. Exp. Med.* **193**, 621–630 (2001).
 121. Luther, S. A., Ansel, K. M. & Cyster, J. G. Overlapping Roles of CXCL13, Interleukin 7 Receptor α , and CCR7 Ligands in Lymph Node Development. *J. Exp. Med.* **197**, 1191–1198 (2003).
 122. Niemeyer, C. M. *et al.* Expression of human interleukin-3 (multi-CSF) is restricted to human lymphocytes and T-cell tumor lines. *Blood* **73**, 945–951 (1989).
 123. Yang, Y. C. *et al.* Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell* **47**, 3–10 (1986).
 124. Cuturi, M. C. *et al.* Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **169**, 569–583 (1989).
 125. Plaut, M. *et al.* Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* **339**, 64–67 (1989).
 126. Schrader, J. W. in *The Cytokine Handbook* 201–225 (2003). doi:10.1016/B978-012689663-3/50013-2
 127. Schroeder, J. T. Basophils: Emerging roles in the pathogenesis of allergic disease. *Immunol. Rev.* **242**, 144–160 (2011).
 128. Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Durand, I. & Banchereau, J. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human

- dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* **87**, 2376–85 (1996).
129. Grouard, B. G. *et al.* The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic. *J. Exp. Med.* **185**, 1101–1111 (1997).
 130. Williams, G. T., Smith, C. a, Spooncer, E., Dexter, T. M. & Taylor, D. R. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* **343**, 76–79 (1990).
 131. Brown, M. P. *et al.* Reconstitution of early lymphoid proliferation and immune function in Jak3-deficient mice by interleukin-3. *Blood* **94**, 1906–14 (1999).
 132. Kinashi, T. *et al.* Differentiation of an interleukin 3-dependent precursor B-cell clone into immunoglobulin-producing cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 4473–7 (1988).
 133. Miyamoto, K., Tsuji, K., Maekawa, T., Asano, S. & Nakahata, T. Inhibitory effect of interleukin 3 on early development of human B-lymphopoiesis. *Br. J. Haematol.* **114**, 690–7 (2001).
 134. Perrigoue, J. G. *et al.* MHC class II–dependent basophil–CD4 + T cell interactions promote T H 2 cytokine–dependent immunity. *Nat. Publ. Gr.* **10**, (2009).
 135. Yu, N. L., Chiang, Y. J. & Yen, J. J. Y. GATA factors are essential for transcription of the survival gene E4bp4 and the viability response of interleukin-3 in Ba/F3 hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 27144–27153 (2002).
 136. Kamizono, S. *et al.* Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. *J. Exp. Med.* **206**, 2977–86 (2009).
 137. Kuribara, R. *et al.* Two distinct interleukin-3-mediated signal pathways, {Ras-NFIL3} {(E4BP4)} and {Bcl-xL,} regulate the survival of murine {pro-B} lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2754–2762 (1999).
 138. Leverrier, Y. *et al.* In bone marrow derived Baf-3 cells, inhibition of apoptosis by IL-3 is mediated by two independent pathways. *Oncogene* **14**, 425–430 (1997).
 139. Cowell, I. G. E4BP4/NFIL3, a PAR-related bZIP factor with many roles. *BioEssays* **24**, 1023–1029 (2002).
 140. Ealey, K. N. & Koyasu, S. How Many Subsets of Innate Lymphoid Cells Do We Need? *Immunity* **46**, 10–13 (2017).
 141. Dahlin, J. S. *et al.* Lin- CD34hi CD117Int/hi FcεRI+ cells in human blood constitute a rare population of mast cell progenitors. *Blood* **127**, 383–391 (2016).
 142. Zhang, M., Murphy, R. F. & Agrawal, D. K. Decoding IgE Fc receptors. *Immunol. Res.* **37**, 1–16 (2007).
 143. Kepley, C. L., Craig, S. S. & Schwartz, L. B. Identification and partial characterization of a unique marker for human basophils. *J. Immunol.* **X**, 6548–6555 (1995).
 144. Hauswirth, A. W. *et al.* Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 102–109 (2002).
 145. Santos Alexandra F., Bécares Natalia, Stephens Alick, T. V. and L. G. The expression of CD123 can decrease with basophil activation: implications for gating strategy of the basophil. *Clin. Transl. allegy* **6**, (2016).
 146. Chirumbolo, S. Commentary: The expression of CD123 can decrease with basophil activation: Implications for the gating strategy of the basophil activation test. *Front. Immunol.* **7**, 1–11 (2016).
 147. MacGlashan, D. IgE and FcεRI regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1050**, 73–88 (2005).
 148. Spits, H. & Cupedo, T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage

- relationships, and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 647–75 (2012).
149. Ishiguro, B. A. *et al.* Id2 Expression Increases With Differentiation of Human Myeloid Cells. *J. Immunol.* **87**, 5225–5231 (1996).
 150. Shigematsu, H. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* **21**, 43–53 (2004).
 151. Miyamoto, T. & Akashi, K. Lineage Promiscuous Expression of Transcription Factors in Normal Hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* **81**, 361–367 (2005).
 152. Kondo, M. *et al.* Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* **407**, 383–386 (2000).
 153. Al-shami, A. *et al.* A Role for Thymic Stromal Lymphopoietin in CD4 + T Cell Development. *J. Exp. Med.* **200**, 159–168 (2004).
 154. Reche, P. A. *et al.* Human Thymic Stromal Lymphopoietin Preferentially Stimulates Myeloid Cells. *J. Immunol.* **167**, 336–343 (2001).
 155. Liu, Y.-J. *et al.* TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 193–219 (2007).
 156. Sciumè, G., Le, M. T. & Gadina, M. HiJAKing Innate Lymphoid Cells? *Front. Immunol.* **8**, 1–5 (2017).
 157. Plé, C. *et al.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Reciprocally Regulate IL-22 and IL-17 Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Both Healthy and Asthmatic Subjects. *PLoS One* **10**, e0122372 (2015).
 158. Kim, C. H., Hashimoto-Hill, S. & Kim, M. Migration and Tissue Tropism of Innate Lymphoid Cells. *Trends Immunol.* **37**, 68–79 (2016).
 159. Eberl, G., Colonna, M., Di Santo, J. P. & McKenzie, A. N. J. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science (80-.)*. **348**, 1–8 (2015).
 160. Artis, D. & Spits, H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 1–9 (2015). doi:10.1038/nature14189
 161. Kim, B. S. *et al.* Basophils promote innate lymphoid cell responses in inflamed skin. *J. Immunol.* **193**, 3717–25 (2014).
 162. Fuhlbrigge, R. C., Kieffer, J. D., Armerding, D. & Kupper, T. S. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* **389**, 978–81 (1997).
 163. O’Shea, J. J. & Paul, W. E. Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells. *Science (80-.)*. **327**, 1098–1102 (2010).
 164. Weinkove, R., Filbey, K. & Le Gros, G. Immunity without innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **17**, 1237–1238 (2016).
 165. Mattner, J. & Wirtz, S. Friend or Foe? The Ambiguous Role of Innate Lymphoid Cells in Cancer Development. *Trends Immunol.* **xx**, 1–10 (2016).
 166. Crome, S. Q. *et al.* A distinct innate lymphoid cell population regulates tumor-associated T cells. *Nat. Med.* **23**, 368–375 8 (2017).

10. ANEXOS

Anexo 1. Identificación subpoblaciones en sangre de cordón umbilical

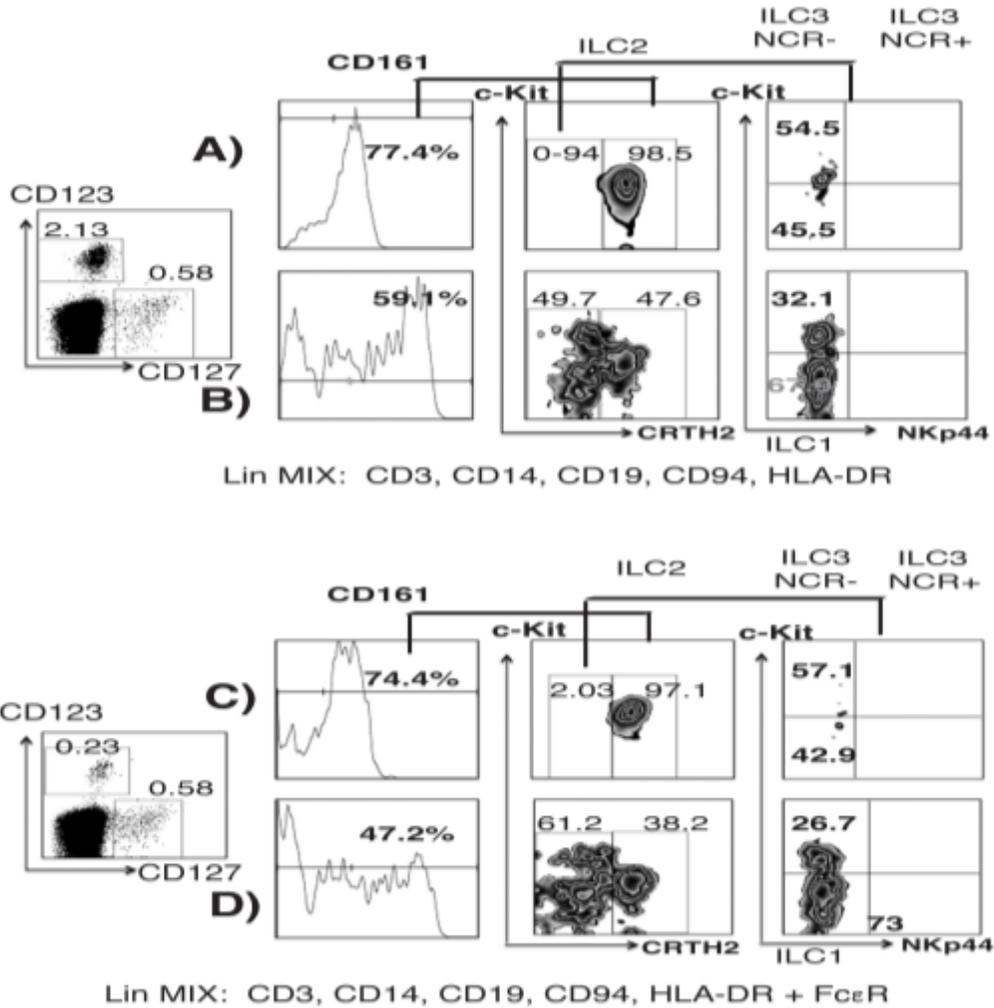


Figura suplementaria 1. Subpoblaciones de ILC identificadas en sangre de cordón umbilical.

Clasificación de las subpoblaciones de ILC, analizadas como células CD161⁺ y posteriormente para ILC1 (CRTH2⁻ c-Kit⁻), ILC2 (CRTH2⁺) e ILC3 (CRTH2⁻, c-Kit⁺) dentro de las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ (A) y Lin⁻ CD127⁺ (B). Utilizando para la exclusión de células linaje positivas los marcadores: CD3, CD14, CD94 Y HLA-DR. En C) y D) se muestra el análisis dentro de las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺, pero utilizando los marcadores: CD3, CD14, CD94, HLA-DR y FcεR para la exclusión de células linaje positivas. Las gráficas mostradas son representativas de al menos 3 muestras independientes.

Anexo 2. Estrategia de análisis y purezas del aislamiento de células mediante citometría de flujo.

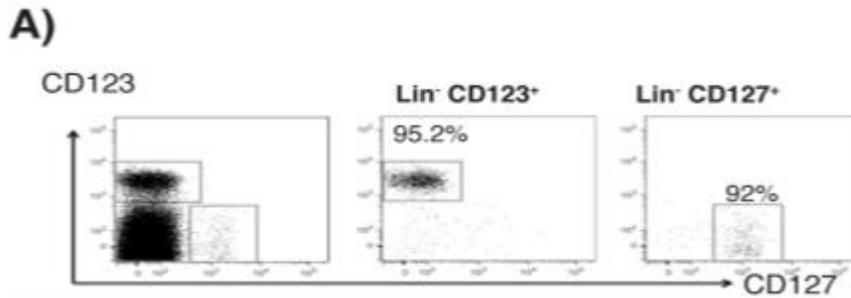


Figura suplementaria 2. Estrategia de análisis y purezas obtenidas después del aislamiento de poblaciones por citometría de flujo.

A) Porcentajes de células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ después de ser aisladas mediante “cell sorting”. Las células fueron previamente identificadas dentro de la región linfoide y como células linaje negativas. Los porcentajes mostrados son representativos de al menos 20 experimentos.

Anexo 3. Expresión de los factores de transcripción NFIL3, PLZF y TOX en respuesta a IL-7.

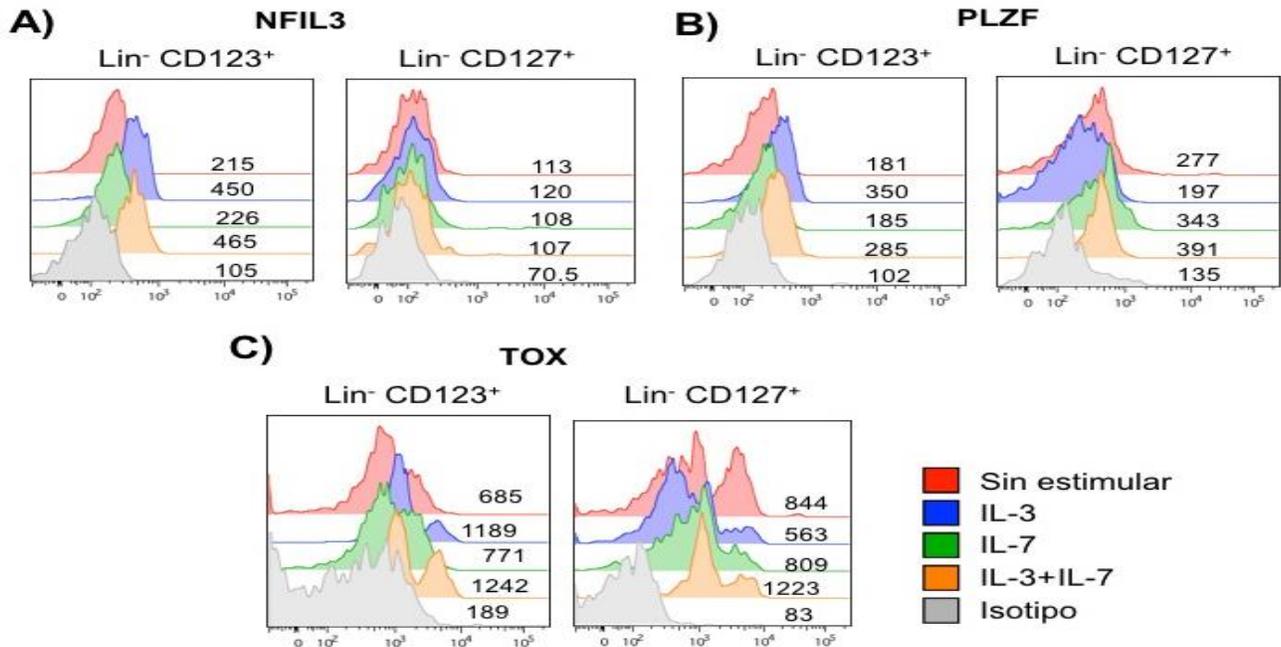


Figura suplementaria 3. La IL-3 y no la IL-7 regula la expresión de factores de transcripción en la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$.

Se muestra la expresión de los factores de transcripción: NFIL3 (A), PLZF (B) y TOX (C) en las poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ de SP +/- IL-3, IL-7 o IL-3+IL-7 (18 hrs). Rojo: sin estimular, Azul: +IL-3, Verde: + IL-7, Naranja: IL-3+IL-7, Gris: Control de isotipo. Se muestran los valores de Medianas de Fluorescencia (MF) representativos de al menos tres experimentos independientes.

Anexo 4.

Tabla 1. Anticuerpos empleados en tinciones de superficie e intracelulares.

Tinciones de superficie				
	Anticuerpo	Fluorocromo	Clona	Marca
Marcadores de Linaje	Anti-CD3	FITC or PE	HIT3a	Biolegend San Diego, California
	Anti-CD14	FITC or PE	HCD14	Biolegend San Diego, California
	Anti-CD19	FITC or PE	HIB19	Biolegend San Diego, California
	Anti-CD94	FITC or PE	DX22	Biolegend San Diego, California
	Anti-HLA-DR	FITC or PE	L243	Biolegend San Diego, California
	Marcadores Adicionales de Linaje	Anti-CD34	FITC	561
Anti-TCR α/β		FITC	IP26	Biolegend San Diego, California
Anti-CD66		FITC	B1.1/CD66	BD Biosciences, San Jose, California
Anti-IL5R		PE	A14	BD Biosciences, San Jose, California
Anti-CD177		PE	MEM-166	Biolegend San Diego, California
Anti-CD16		PE	3G8	Biolegend San Diego, California
Anti FceR		FITC/PECy7	AER-37(CRA-1)	Biolegend San Diego, California
Marcadores de Células Dendríticas	Anti-BDCA-1	APC	AD5-8E7	Miltenyi Biotec, BG, Germany
	Anti-BDCA-2	APC	AC144	Miltenyi Biotec, BG, Germany
	Anti-BDCA-3	Biotin	AD5-14H12	Miltenyi Biotec, BG, Germany
	Anti-BDCA-4	Biotin	AD5-17F6	Miltenyi Biotec, BG, Germany
	Anti-CD11c	APC	S-HCL-3	BD Biosciences, San Jose, California
Marcadores de Migración	Anti-CLA	Biotin	HECA-452	BD Biosciences, San Jose, California
	Anti-CCR6	PE	TG7/CCR6	Biolegend San Diego, California
	Anti-CXCR4	APC	12G5	Biolegend San Diego, California
	Anti-CD62L	FITC	SK11	BD Biosciences, San Jose, California
Marcadores de ILC	Anti-CD123	Biotin/PE/PE-Cy5	6H6	Biolegend San Diego, California

	Anti-CD127	Brilliant Violet 421	A019D5	Biolegend San Diego, California
	Anti-CD127	AlexaFluor 647	HIL-7R-M21	BD Biosciences, San Jose, California
	Anti-CD90	PE-Cy7	5E10	Biolegend San Diego, California
	Anti-CD132	APC	TUGh4	Biolegend San Diego, California
	Anti-CD161	PE-Cy7	HP3G10	Biolegend San Diego, California
	Anti-CRTH2	APC-Cy7/Biotin	BM16	Biolegend San Diego, California
	Anti-CD117 (c-kit)	PE-Cy5	A3C6E2	Biolegend San Diego, California
	Anti-NKp44	APC	P44-8	Biolegend San Diego, California
	Anti-AhR	PE/eFluor660	FF3399	eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, California
	Anti-IL-23R	PerCP	218213	(R&D systems, Minneapolis, USA),
	Anti-49d (alpha 4 integrin)	FITC	9F10	Biolegend San Diego, California
Marcadores de basófilos	Anti-CD203c	APC	NP4D6	Biolegend San Diego, California
	Anti-CCR3	APC-Cy7	5E8	Biolegend San Diego, California
	2D7	PE	Basophil/2 D7	Biolegend San Diego, California

Tinciones intracelulares				
	Anticuerpo	Fluorocromo	Clona	Marca
Factores de Transcripción	Anti-T-bet	PerCP-Cy5.5	4B10	Biolegend San Diego, California
	Anti-GATA3	AlexaFluor 488	L50-823	BD Biosciences, San Jose, California
	Anti-RORgt	APC	AFKJS-9	eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, California
	Anti-NFIL3	PE	MABA223	eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, California
	Anti-PLZF	FITC	Mags.21F7	eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, California
	Anti-TOX	APC	TXRX10	eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, California
	Anti-TCF-1	AlexaFluor 647	7F11A10	Biolegend San Diego, California
	Citocinas	Anti-IL-2	APC	5344.111
Anti-IL-4		PerCP-Cy5.5	MP4-25D2	Biolegend San Diego, California
Anti-IL-8		APC	8CH	eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, California
Anti-IL-17		AlexaFluor 488	eBio64DEC17	eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, California
Anti-IL-22		eFluor660	22URTI	Biolegend San Diego, California
Anti-IFN-g		PerCP-Cy5.5	4S.B3	Biolegend San Diego, California
Anti-IL-13		PerCP-Cy5.5	JES10-5A2	Biolegend San Diego, California
Otros	Streptavidina	PE-Cy7		BD Biosciences, San Jose, California
	Streptavidina	APC-Cy7		BD Biosciences, San Jose, California

Anexo 5.

Tabla 2 y 3. Estímulos para cultivo celular

	Estímulo	Concentración	Marca
	IL-3	10 ng/mL	PeptoTech, New Jersey, USA.
	IL-7	50 ng/mL	PeptoTech, New Jersey, USA.
Cóctel ILC1	IL-12	50 ng/mL	PeptoTech, New Jersey, USA.
	IL-15	50 ng/mL	PeptoTech, New Jersey, USA.
Cóctel ILC2	IL-2	30 ng/mL	PeptoTech, New Jersey, USA.
	IL-33	100 ng/mL	PeptoTech, New Jersey, USA.
Cóctel ILC3	IL-2	30 ng/mL	PeptoTech, New Jersey, USA.
	IL-1 β	50 ng/mL	PeptoTech, New Jersey, USA.
	IL-23	50 ng/mL	PeptoTech, New Jersey, USA.

Ensayo de entrecruzamiento con IgE humana		
Estímulo	Concentración	Marca
Human IgE Myeloma	1mg/mL	Merck-Millipore, Massachusetts, USA
Mouse anti-human IgE (clone: G7-18)	2mg/mL	BD Biosciences, San Jose, California



A Human Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} Population Endowed with ILC Features and Migratory Capabilities Contributes to Immunopathological Hallmarks of Psoriasis

Luz María Mora-Velandia^{1,2}, Octavio Castro-Escamilla^{1,2}, Andrés González Méndez¹, Cristina Aguilar-Flores¹, Martha Velázquez-Avila³, María Isabel Tussié-Luna^{4,5}, Juan Téllez-Sosa⁶, César Maldonado-García⁷, Fermín Jurado-Santacruz⁷, Eduardo Ferat-Osorio¹, Jesus Martínez-Barnetche⁶, Rosana Pelayo³ and Laura C. Bonifaz^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Heiko Mühl,
Goethe University Frankfurt, Germany

Reviewed by:

Marina Cella,
Washington University
School of Medicine, USA
Anja Fuchs,
Washington University in St. Louis,
USA

*Correspondence:

Laura C. Bonifaz
labonifaz@yahoo.com

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 25 August 2016

Accepted: 07 February 2017

Published: 02 March 2017

Citation:

Mora-Velandia LM, Castro-Escamilla O, Méndez AG, Aguilar-Flores C, Velázquez-Avila M, Tussié-Luna MI, Téllez-Sosa J, Maldonado-García C, Jurado-Santacruz F, Ferat-Osorio E, Martínez-Barnetche J, Pelayo R and Bonifaz LC (2017) A Human Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} Population Endowed with ILC Features and Migratory Capabilities Contributes to Immunopathological Hallmarks of Psoriasis. *Front. Immunol.* 8:176. doi: 10.3389/fimmu.2017.00176

¹Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico, ²Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico, ³Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional 'Siglo XXI', Mexico City, Mexico, ⁴División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico, ⁵Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, Hospital Infantil de México "Federico Gómez", Mexico City, Mexico, ⁶Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, Mexico, ⁷Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua", Secretaría de Salud de la Ciudad de México, Mexico City, Mexico

Innate lymphoid cells (ILC) are members of a heterogeneous family with a lymphoid origin that mimics the T helper (Th) cytokine profile. ILC are involved in early effector cytokine-mediated responses during infections in peripheral tissues. ILC also play an important role in chronic skin inflammatory diseases, including psoriasis. Although classical ILC express CD127, it has been recently reported that the presence of non-classical CD127⁻ ILC populations and an early ILC precursor (EILP) CD127^{low}. ILC development has predominately been investigated in mouse models. However, in humans, different transcription factors have been described for ILC identification. NFIL3 (nuclear factor, IL-3 regulated) is crucial for ILC development in response to IL-7. CD123 (IL-3R α) is usually used to exclude basophils during ILC identification, however, it is unknown if in response to IL-3, NFIL3 could be relevant to induce ILC features in Lin⁻ CD123⁺ populations in addition, is also unknown whether peripheral blood (PB) population with ILC features may have skin-homing potential to participate in skin inflammatory chronic diseases. Here, we report a Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} CD7⁺ CLA⁺ population that share some phenotypic properties with basophils, but expresses several transcription factors

Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor; BCR, B cell receptor; BDCA, blood dendritic cell antigen; cDC, conventional dendritic cells; CLA, cutaneous lymphocyte antigen; CLP, common lymphoid precursor; CRTH2, chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells or prostaglandin D₂ receptor 2; CS, control skin; GATA-3, trans-acting T-cell-specific transcription factor; HD, healthy donors; HLA-DR, human leukocyte antigen-antigen D related; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; ILC, innate lymphoid cells; NCR, natural cytotoxicity receptors; NFIL3, nuclear factor, IL-3 regulated; NK, natural killer; PB, peripheral blood; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; pDCs, plasmacytoid dendritic cells; PLZF, promyelocytic leukemia zinc finger; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; ROR- γ t, RAR-related orphan receptor gamma; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; T-bet, T-box transcription factor; TCR, T cell receptor; TCF-1, T cell factor-1; Th, T helper; TOX, thymocyte selection-associated high-mobility group box protein.

for ILC commitment such as inhibitor of DNA binding 2 (Id2), NFIL3, promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF), thymocyte selection-associated high-mobility group box protein (TOX), and T cell factor-1 (TCF-1). In addition, this population expresses different ILC markers: CD132, CD90, CD161, α 4 integrin, c-Kit, CRTH2, AhR, and IL-23R. IL-3 prevents apoptosis and increases their NFIL3, TOX, and PLZF expression. In PB, the CD123⁺ CD127^{low} population is predominantly a conspicuous population that expresses T-bet and ROR γ t. The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population in PB has a limited Th type cytokine expression and highly expresses IL-8. The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population expresses skin-homing receptors (cutaneous lymphocyte antigen and CXCR4) and transmigrates through endothelial cells in response to SDF-1. An equivalent Lin⁻ CD123^{low} population was identified in control skin, which shows a broader phenotypic diversity and cytokine production, including IL-22 and IL-17. Remarkably, the CD123^{low} population in the lesion and non-lesion skin of psoriasis patients expresses IL-17 and IL-22. Our findings suggest the identification of an alternative Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population with ILC features endowed with migratory capabilities that might contribute to immunopathological hallmarks of psoriasis.

Keywords: innate lymphoid cells, psoriasis, IL-3R α , IL-17, SDF-1, CXCR4 axis, skin inflammation

INTRODUCTION

Innate lymphoid cells (ILC) have been defined as a heterogeneous family derived from a CD7⁺ common lymphoid precursor (CLP) (1–3). During the previous decade, several ILC populations that participate in the defense against pathogens and inflammatory diseases have been described mainly in mice (4, 5). The identification of ILC populations in humans, as well as their role in disease pathogenesis, comprises a topic of extensive investigation.

Several groups have used distinct criteria and markers for ILC identification. ILC have a classical lymphoid morphology; they lack T cell receptor or BCR expression and are considered lineage negative (Lin⁻) cells. In humans, the most common lineage markers include CD3, CD19 (for T and B cells), CD14 (monocytes), and CD11c, as well as blood dendritic cell antigen (BDCA)-1, -2 (dendritic cells). CD123 expression has been used to exclude plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and basophils, while Fc ϵ R for basophils and mast cells (6, 7).

Classical ILC in human peripheral blood (PB) express CD127. However, a non-classical category of ILC CD127⁻ (8) as well as an early ILC precursor (EILP) CD127^{low} (9) has been recently reported. In addition to CD127, other markers have been used in human PB for ILC identification, ILC express CD132 (γ common chain), which is crucial for development, as well as CD90 and CD161 as ILC markers (2). The expression of α 4 β 7 integrin has been reported in ILC precursors in mice (10–12). In addition to surface markers, several transcription factors have been used for ILC identification. The transcription factor inhibitor of DNA binding 2 (Id2) is essential for identification and lineage commitment (13, 14). In addition to Id2, transcriptional factors, such as thymocyte selection-associated high-mobility group box protein (TOX) and promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF),

have been described as essential for ILC development (15–17); in humans, these additional transcriptional factors have primarily been used as ILC lineage-related markers. Recently, T cell factor-1 (TCF-1) has been also described in mice as crucial for ILC development (18). Remarkably, it has been demonstrated that the nuclear factor, IL-3 regulated (NFIL3) is a crucial transcription factor in ILC development in response to IL-7 (19). Although CD123 (IL-3R α) is usually used to exclude basophils and mast cells during ILC identification, it is unknown if in response to IL-3, NFIL3 might be relevant to induce ILC features in Lin⁻ CD123⁺ populations.

Based on the criteria used to identify ILC in mice, three main groups of ILC have been described and identified in humans (2, 20) as CD161⁺. In addition, ILC1 are c-Kit⁻ and CRTH2⁻ and express T-bet and IFN- γ , while ILC2 are c-Kit⁺ and CRTH2⁺ and express GATA-3, IL-4, IL-5, and IL-13, and ILC3 are c-Kit⁺, CRTH2⁻ are AhR⁺ (aryl hydrocarbon receptor), IL23R⁺ CCR6⁺ and express ROR γ t, IL-17, and IL-22 (6, 21, 22). ILC3 may also express natural killer (NK) receptors such as NKp44 (22, 23). It has been proposed that ILC mimic the effector function of T helper (Th) lymphocytes (Th1, Th2, and Th17). However, ILC activation is mainly mediated by cytokines expressed by other innate cells, such as dendritic cells, macrophages, or stromal cells (24, 25). In general, the most frequent *in vitro* conditions used to resemble the *in vivo* activation include the use of IL-12 and IL-15 or IL-18 for ILC1, IL-25, IL-33, and TSLP for ILC2 and IL-1 β , IL-2 and IL-23 for ILC3 and, in some cases, the presence of IL-7 (26).

As a result of the increasing numbers of ILC studies, it has been possible to establish the presence and diversity of classical and, to a less extent, non-classical ILC populations in different peripheral tissues (27); mouse models have demonstrated that ILC together with other innate cells are the first line of defense

against pathogens (28–31). Recently, a regulatory role for ILC populations have been reported (32). Therefore, in humans, there is increasing evidence that ILC play a role in several pathologies, such as allergies and chronic inflammatory skin disorders (33), including psoriasis (34, 35). Interestingly, the proportions of the different subsets (ILC1, ILC2, and ILC3) among tissues appear to be different, and it also appears that the local microenvironment may influence the “specialized” functions of ILC (36, 37). It has been proposed that ILC in PB may represent a reservoir of ILC in which their functional features may be distinct from peripheral tissues (7, 24, 38). Nevertheless, the mechanisms that underlie the migration of ILC into different tissues under steady state or inflammatory conditions are in the early stages of investigation. In particular, for skin migration, it has been reported that in PB, ILC2 and ILC3 express cutaneous lymphocyte antigen (CLA) (39, 40), which is the main assumed mechanism of ILC skin tropism under steady-state conditions; however, additional migration mechanisms under inflammatory conditions have not been established to date.

In the skin, one of the main human pathologies in which the participation of ILC has been investigated is psoriasis. It has been described that blood and skin samples from patients have increased ILC3 NCR⁺ frequencies (40, 41), and although the IL-22-producing ILC3 had been well identified, the production of IL-17 has been reported in lymphoid CD3⁻ cells. These findings suggest that in the skin, other cell populations (Lin⁻ CD45⁺ CD3⁻) exist that produce IL-17. Nevertheless, it has not been well established whether these cells are related to the ILC lineage.

Here, we identified a Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population in the PB of healthy donors (HD) that express several ILC features and in which IL-3 appears to be essential for their maintenance and identity. Interestingly, this Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population highly expresses CLA and exhibits migratory potential in response to SDF-1. Remarkably, a similar Lin⁻ CD123^{low} population was identified in control skin (CS) and importantly in psoriasis skin (PS) biopsies with the capability to express IL-22 and IL-17. These findings suggest that this population with ILC features may contribute to the immunopathological features of psoriasis.

MATERIALS AND METHODS

Blood Sample Collection

Buffy coats of HD were obtained from the Blood Bank from the “Hospital Infantil de México: Federico Gómez.” Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated with Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway) from buffy coats.

Skin Biopsies from CS and Psoriasis Patients

Control skin was obtained from remnant skin following plastic or abdominal surgeries that was free from dermatologic pathologies from the “Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepulveda CMN Siglo XXI.” Patients were recruited from the dermatology clinic of the *Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua*.

Fifteen patients who fulfilled the diagnostic criteria for psoriasis in plaque were included in this study prior to treatment initiation. Patient biopsies were obtained with a 5–6 mm punch.

Skin Cell Collection

Skin samples were placed overnight in RPMI medium and dispase II (Grade II protease, Roche, Switzerland). The dermis was then mechanically separated from the epidermis. Dermal cells were obtained by allowing migration from dermal segments placed in culture in RPMI medium for 7 days. The collected cells were used for activation experiments, and the cell supernatants were used as chemoattractant stimuli in migration assays.

Flow Cytometry Analysis and Sorting

In order to block Fc receptors, PBMCs were incubated with an in-house-made buffer containing 2% horse serum. Cells were stained with a cocktail of antibodies (complete list included in Supplementary Material). Fixation was performed using 4% paraformaldehyde (PFA). All antibodies were isotype-matched with their respective fluorophore. Intracellular assessment of cytokines and transcriptional factors were performed using Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) or the Factor Fixation and Permeabilization Buffer Set (Biolegend, San Diego, CA, USA), respectively. Cells were incubated with antibodies for 30 min at room temperature. Before cell fixation, Hoechst 33342 staining assessed cell viability during assays. The samples were acquired using a FACS Canto (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and were analyzed with Flowjo software (Tree Star). For cell isolation, PBMCs were stained with PE-conjugated lineage marker antibodies. Lineage⁺ cells (CD3⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD94⁺, and HLA-DR⁺) were depleted using anti-PE Microbeads and LD columns (Miltenyi-Biotec, BG, Germany). The cells were sorted from the lymphoid region and according to CD123 and CD127 expression using a FACS Aria II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Heat Map Construction

The median fluorescence intensities (MFs) were determined for each cell surface marker and each subpopulation; the minimum value reported (gray) corresponds to the isotype control (MF), and the maximum value reported (red) corresponds to the cell population with the highest MF value.

Imaging Flow Cytometry

The morphology of total pre-enriched Lin⁻ CD123⁺ cells was evaluated in PBMCs previous to depletion of Lineage⁺ cells (as described above) and stained with anti-CD123 and the nuclear dye DAPI (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Cells were acquired using the Amnis ImageStream Mark II and analyzed by the IDEAS[®] software (Merck-Millipore, MA, USA).

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from a pool of three different cell donors using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and cDNA was synthesized using Maxima First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), according

to the manufacturer's instructions. Quantitative gene expression for human IL7R α or for the housekeeping human GAPDH gene was performed using Maxima Syber Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and a Rotorgene Real Time PCR System (Qiagen, Hilden, Germany). Used primers: IL7R α -Forward: 5' AGG ATG AAA ACA AAT GGA CGC A 3'. IL7R α -Reverse: 5' CCT TTA AAA TAG TGA TCA GGG ATG G 3'. Size of cDNA product: 238 bp.

Incomplete D_H-J_H Rearrangements Analysis

Genomic DNA was extracted from sorted cell populations using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The identification of incomplete D_H-J_H rearrangements was performed using the BIOMED-2 primer sets as described (42). Briefly, two independent PCR reactions per DNA sample were set: a multiplexed PCR reaction combining a single J_H consensus primer and six D_H primers (Tube D) corresponding to six of the seven D_H segment families. The second reaction contained the same J_H primer and a single D_{H7} primer (Tube E). Each reaction product was subjected to capillary electrophoresis using the Agilent DNA 1000 chip in the Agilent 2100 Bioanalyzer system.

Cell Activation

Peripheral blood mononuclear cells or skin cells were stimulated using the cell stimulation cocktail and the protein transport inhibition cocktail (for the last 6 h of culture) (eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) to assess the production of cytokines via intracellular staining. When indicated, IL-3 was added to the culture for 18 h to evaluate the phenotype and expression of transcriptional factors. Furthermore, ILC1, ILC2, and ILC3 cocktails (Supplementary Material) were added to the culture for 18 h to determine the expression of intracellular cytokines; IL-3 and IL-7 were included in all cocktails.

IgE Crosslinking Assay

Peripheral blood mononuclear cells were incubated with 1 μ g/mL of human IgE (Merck-Millipore, MA, USA) during 2 h, washed, and incubated with 2 μ g/mL of anti-human IgE (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) during 30 min; the activation of cells was assessed by the expression of phenotypic markers at the end of incubation.

Immunofluorescence

Goat anti-Id2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), Biotin anti-goat IgG, Isotype control, AlexaFluor 488 Streptavidin (Jackson-ImmunoResearch, West Grove, CA, USA) and Vectashield-DAPI (Vector-laboratories, Burlingame, CA, USA) were used to stain sorted populations. Images were acquired using a Leica TCS SP8x Confocal Microscope (Wetzlar, Germany) and were analyzed with Leica software.

Cell Viability Assay

Isolated Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} cells were cultured in the presence or absence of IL-3 (PeproTech, NJ, USA) for 3 days. Cells were collected and stained using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according

to the manufacturer's instructions. Samples were acquired using a FACS Canto (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and were analyzed with Flowjo software (Tree Star).

Cytokine Quantification

Isolated Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} from the lymphoid region or Lin⁻ CD127⁺ cells were cultured in the presence or absence of IL-3 (PeproTech, NJ, USA) for 18 h \pm stimulation cocktail (eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) during the last 6 h of culture. The supernatants were collected and stored (-80° C) until analysis. The quantification was performed using a personalized (Supplementary Material) Magnetic Luminex Screening Assay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Sample acquisition and analysis were performed in a MagPix instrument (Luminex, TX, USA).

Migration Assay in Transwell System

Using a transwell system (Corning, NY, USA), migration in response to stimuli, SDF-1 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) or supernatants from CS or PS cell cultures was assessed after 3 h. Migration was also assessed in the presence of blocking anti-CXCR4 (Biolegend, San Diego, CA, USA). The transmigration assays using endothelial cells, the upper chamber of the transwell was covered with attachment factor (Gibco, Thermo Scientific, MA, USA) during 1 h/37 $^{\circ}$. Human umbilical vein endothelial cells were cultured for 1–2 days (with supplemented EGM-2 medium, Lonza, Switzerland) in the previous covered well to promote monolayer formation. The monolayer was subsequently washed with PBS 1 \times and used for the migration assay. 2 \times 10⁶ PBMCs per milliliter were placed in the upper chamber in the presence or absence of SDF-1 as stimuli to assess migration after 4 h. Cells from the upper and lower chambers were counted using a microscope and were analyzed by flow cytometry.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA) software. The non-parametric Mann-Whitney *U* test was used to calculate the statistical significance between the groups. All *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

A Human Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} Cell Population with Lymphoid and Basophil Features in PB

To determine the presence of Lin⁻ CD123⁺ (IL-3R α) population in the PB of HD, cells with a lymphoid morphology and lineage negative (Lin⁻) for T cells (CD3⁻), B cells (CD19⁻), monocytes (CD14⁻), NK cells (CD94⁻), and dendritic cells (HLA-DR⁻) were evaluated. Two distinct Lin⁻ cell populations were identified: the classical CD127⁺ population and a CD123⁺ with low expression of CD127 by both, flow cytometry and PCR (Figures 1A,B). The cell frequency of the CD123⁺ CD127^{low} population is approximately 0.7–1.4%, while the CD127⁺ population is

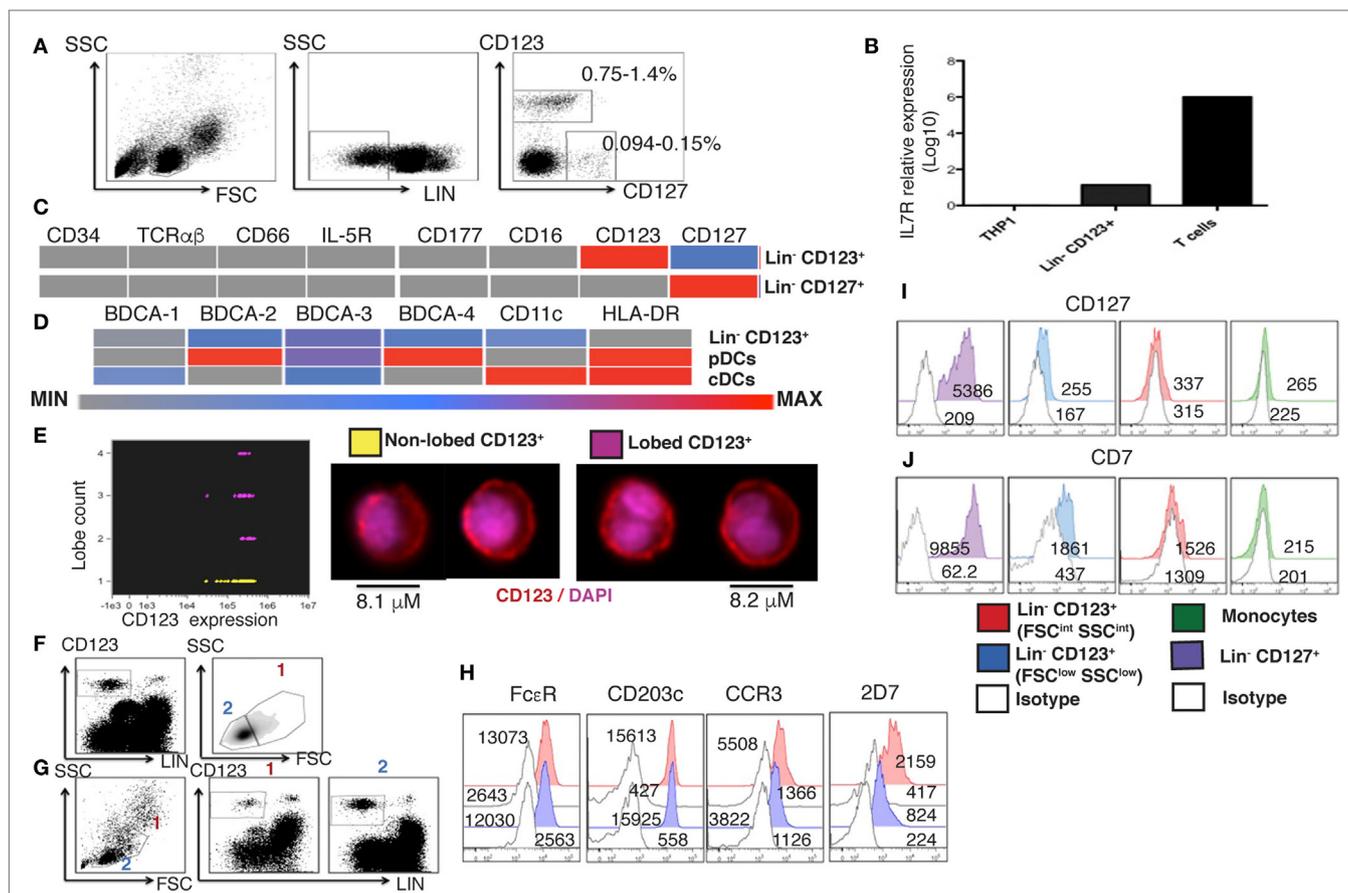


FIGURE 1 | A human Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population with lymphoid and basophil features in peripheral blood. (A) From left to right: gate analysis on lymphoid cells, exclusion of lineage positive cells and identification of Lin⁻ CD123⁺ and Lin⁻ CD127⁺ populations. Cell frequencies (%) data represent the media values from 30 human blood samples. **(B)** Lin⁻ CD123⁺ (isolated from the lymphoid region and gated as shown in Figure S1A in Supplementary Material) and T lymphocytes purified from a pool of three human blood samples by cell sorting were assessed for the expression of IL7R α by quantitative RT-PCR. The monocyte cell line THP1 was used as negative control. Relative expression was normalized to GAPDH gene expression values. **(C,D)** Heat maps, representative of three independent experiments, are shown. Median fluorescence intensity (MF) values for the exclusion of additional lineage and dendritic cell markers, respectively. Color-coded scale is shown under the heat map from minimum (isotype) to maximum values. pDCs, plasmacytoid dendritic cells; cDCs, conventional dendritic cells. **(E)** Imaging flow cytometry analysis of total pre-enriched Lin⁻ CD123⁺ cells. The graph at the left shows CD123 expression vs. lobe count that categorizes enriched Lin⁻ CD123⁺ cells in to two populations: yellow: non-lobed cells and pink: lobed cells. At the right, the morphology of each population is shown (50 cells of each population were analyzed). **(F,G)** Compared cell analysis with two different gating strategies. **(F)** Lin⁻ CD123⁺ and further FSC vs. SSC, or **(G,H)** FSC vs. SSC followed by Lin⁻ vs. CD123⁺ gating. Both gating strategies showed the identification of two cell populations as FSC^{int} SSC^{int} (1) and FSC^{low} SSC^{low} (2) with a frequency of 0.3–1.1% and 0.7–1.3%, respectively, within total peripheral blood mononuclear cells (cell frequencies (%) represent media values of 10 human blood samples). **(H)** Basophil markers expression in both populations [gated as in panel **(G)**]. **(I,J)** CD127 and CD7 compared expression in different cell populations. Red: Lin⁻ CD123⁺ (FSC^{int} SSC^{int}), blue: Lin⁻ CD123⁺ (FSC^{low} SSC^{low}) [gated as in panel **(G)**], purple: Lin⁻ CD127⁺, green: monocytes, white: isotype for each cell population. MF values representative of three independent experiments are presented.

approximately 0.09–0.15% of the total PBMC cells. The CD123⁺ CD127^{low} population is about 8–10 times more frequent than the CD127⁺ population (Figure 1A). As indicated in Figure 1C, both the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} and CD127⁺ populations are negative for CD34, suggesting that they are not primitive precursor cells, as well as for T cells (TCR α), granulocytes (IL-5R, CD177, and CD66) and NK, monocytes, and neutrophil (CD16). The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} was also negative for conventional dendritic cells (BDCA-1, BDCA-3, and CD11c) and pDCs (BDCA-2, BDCA-4, and HLA-DR) (Figure 1D; Figure S1 in Supplementary Material). As indicated in Figure S1 in Supplementary Material, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population

was absent when anti-Fc ϵ R was included in the lineage cocktail. Therefore, in addition to CD123, we evaluated its morphology and expression of basophil markers, including Fc ϵ R, CCR3, CD203c, and an antigen expressed in the secretory granules of human basophils that is recognized by the monoclonal antibody 2D7 (43). Remarkably, imaging flow cytometry assay identified two populations of total pre-enriched Lin⁻ CD123⁺. As observed in Figure 1E, there is a mixture of lymphocyte cells with not segmented nuclei (no lobes), and cells with a classical basophil morphology (lobed nuclei). In addition, two cell populations by two different gating strategies were identified when Lin⁻ CD123⁺ and then FSC vs. SSC were analyzed (Figure 1F) or upon FSC

vs. SSC and then Lin⁻ vs. CD123⁺ analysis (**Figure 1G**). These two cell populations were further defined as FSC^{int} SSC^{int} (1) and FSC^{low} SSC^{low} (2) with a frequency of 0.3–1.1 and 0.7–1.3%, within total PBMCs, respectively. Both populations showed similar expression of FcεR and CCR3. However, the expression of CD203c and the antigen identified by the 2D7 mAb are substantially lower in the CD123⁺ CD127^{low} population from the lymphoid region, consistent with its morphology (**Figure 1H**). To evaluate the possible lymphoid origin of the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}, we investigated the presence of incomplete D_H-J_H rearrangements as a molecular fingerprint of early lymphoid precursors. As shown in Figures S2 and S3 in Supplementary Material, we could not find significant D_H-J_H rearrangements in the CD127⁺ classical ILC or in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population when compared with B-lymphocytes and acute B cell leukemia cell line NAL-M6. However, the expression of CD7 distinguished the lymphoid-related CD123⁺ cells from the CD123⁺ FSC^{int} SSC^{int} population and monocytes (**Figures 1I,J**). These findings indicate the presence of two Lin⁻ CD123⁺ populations in PB and suggest that CD123⁺ CD127^{low} cells express a mixture of basophil and lymphoid features.

A Human Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} CLA⁺ Population with ILC Features in PB

Several ILC markers were investigated in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} within the lymphoid region. Importantly, such population expressed high levels of CD132 and CD90, compared to the Lin⁻ CD127⁺ population, but low levels of CD161 (**Figure 2A**). In addition, both populations were similar in the low expression of α4 integrin that has been reported in ILC precursors. Higher levels of c-Kit and CRTH2, AhR and IL23R were observed in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} when compared to the Lin⁻ CD127⁺ counterpart, but both populations were NKp44⁻. Although both populations displayed similar amounts of CCR6, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population exhibited a remarkable expression of CXCR4 and of the CLA (**Figure 2A**).

In addition, the transcriptional factor Id2, which is crucial for ILC commitment, was confirmed in these cells. Notably, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} and CD127⁺ populations express Id2 predominantly within nuclei compared to the isotype control, although the staining pattern was distinct (**Figures 2B–F**).

Identity and Maintenance of the ILC Features in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} Population Are Mediated by IL-3

Next, the effect of IL-3 was assessed in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population. Sorted Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} from the lymphoid region cells were cultured in the presence of IL-3; after 3 days, IL-3 enabled the survival of the cells, as more than 90% of the cells cultured without IL-3 died via apoptosis (**Figure 3A**). In addition to Id2 NFIL3, PLZF, TOX, and TCF-1 have been reported as crucial in ILC development (15–17). Notably, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population expressed similar levels of NFIL3 compared with the classic CD127⁺ ILC; however, the CD127⁺ population exhibited a higher expression of PLZF, TOX, and TCF-1. Remarkably, IL-3 was capable of increasing

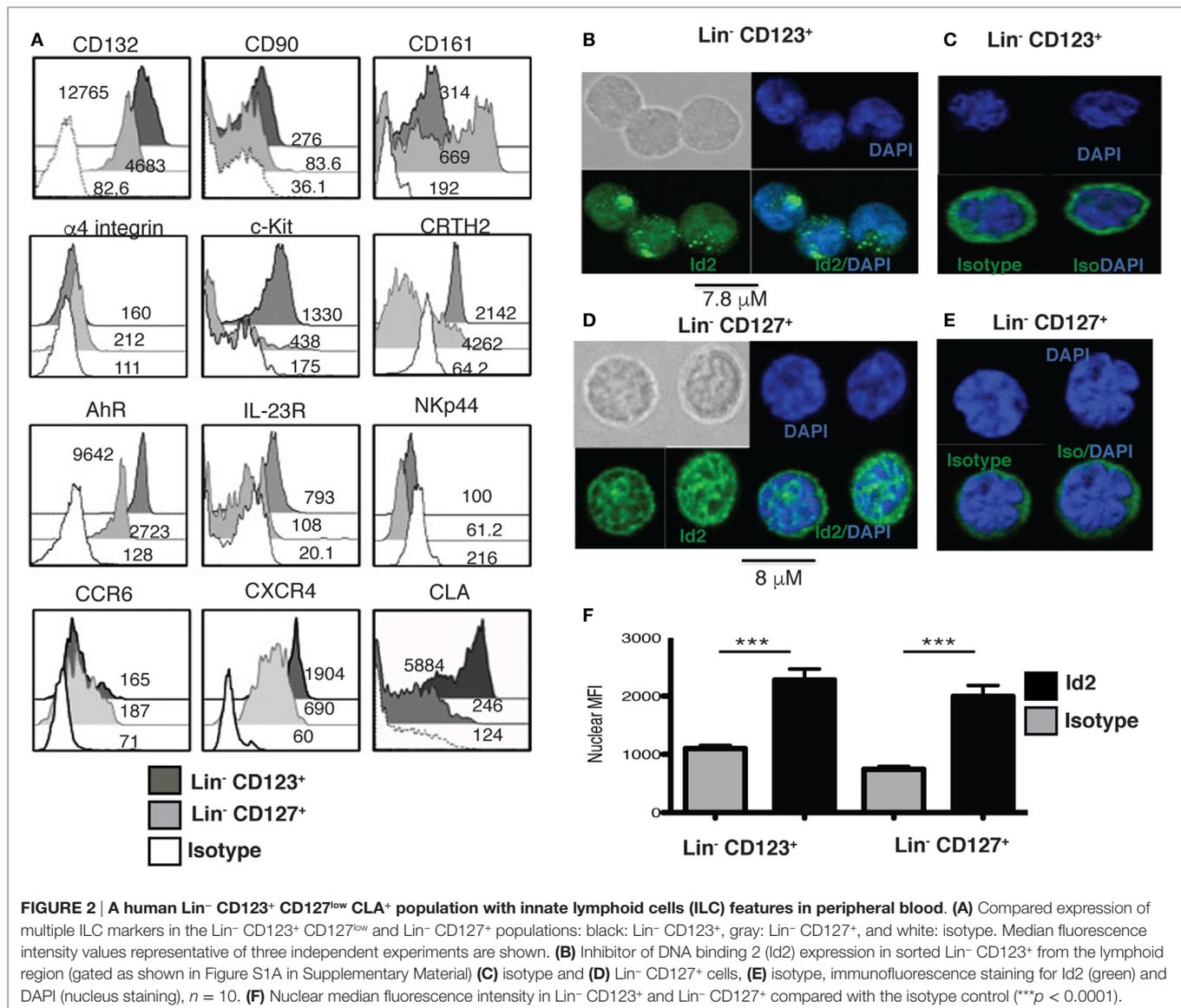
the expression of NFIL3, PLZF, and TOX in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population in contrast to the CD127⁺ population (**Figures 3B–E**). These findings suggest that IL-3 has two main roles in the CD123⁺ CD127^{low} population: maintenance of cell survival and the upregulation of crucial transcriptional factors related to ILC identity.

The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} Population Is Primarily a Conspicuous Population That Expresses T-bet and RORγt

Innate lymphoid cells populations are classified by phenotype in ILC1, ILC2, and ILC3 (44). In this regard, we determined that the majority of cells within the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population displayed a phenotype similar to ILC2, due to expression of CD161^{low}, c-Kit, and CRTH2, although expression of CRTH2 may resemble a basophil-like phenotype. In contrast, a limited number of cells with an ILC1 (CRTH2⁻, c-Kit⁻) or ILC3 (CRTH2⁻, c-Kit⁺, NKp44⁻) phenotype were identified (**Figure 4A**). In contrast, in the CD127⁺ ILC, we identified two populations by the expression of CD161, and ILC1, ILC2, and ILC3 (NKp44) populations were identified (**Figure 4B**). Remarkably, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population had similar expressions of T-bet and RORγt compared with the CD127⁺ population; however, there was only a slight expression of GATA-3 (**Figure 4C**). The small amount of diversity and the expression of T-bet, RORγt, or GATA were not affected in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population by IL-3 culture (data not shown). These findings indicated that the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population in PB is primarily a conspicuous population with minority phenotypic diversity that expresses T-bet and RORγt, which suggests that these transcription factors may be involved in their function.

Steady-State Peripheral Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} Population Expresses Limited Th Type Cytokine Variety

The ILC1, 2, and 3 populations have been described as innate analogs to Th lymphocytes by their capacity to express cytokines (28, 45). Therefore, to determine the Th type cytokine production of the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population, the expression of intracellular cytokines in activated PBMCs was assessed. The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population expresses IFN-γ, IL-2, and IL-4 after PMA/Ionomycin activation (**Figure 5A**). Of note, the population that mainly expresses the cytokines downregulates CD123. The cytokine expression pattern was similar in the classic CD127⁺ ILC population (**Figure 5B**). Remarkably, the expression of IL-17 or IL-22 was not identified in the PB Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population, and only a minor percentage of IL-22⁺ in the CD127⁺ ILC was identified. Considering that it has been reported that ILC may be activated by cytokines, PBMCs were cultured with cytokine cocktails for ILC1, ILC2, or ILC3 activation. **Figures 5C,D** indicate that IFN-γ is expressed in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} and CD127⁺ populations after culture with IL-12 and IL-15. The percentage of IFN-γ⁺ cells is similar in both populations; however, the expression of IFN-γ is increased in the CD127⁺ compared with the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} ILC

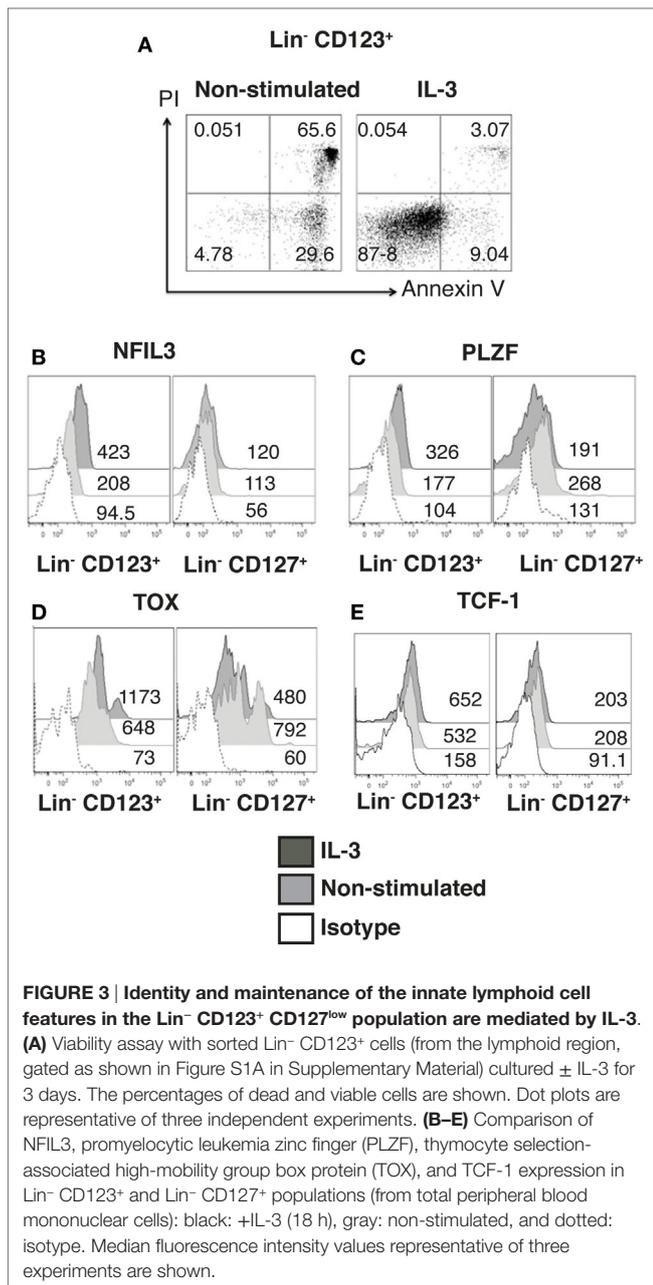


population. The culture with the ILC2 cocktail (IL-33 and IL-2) did not induce the expression of ILC2 type cytokines, such as IL-4 or IL-13, and the culture with the ILC3 cocktail (IL-1 β , IL-2, and IL-23) did not induce the expression of ILC3 type cytokines, such as IL-17 or IL-22 (Figure S3 in Supplementary Material). These findings indicate that the steady-state peripheral Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population expresses limited Th type cytokine variety.

The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} Population in PB Expresses High Levels of IL-8

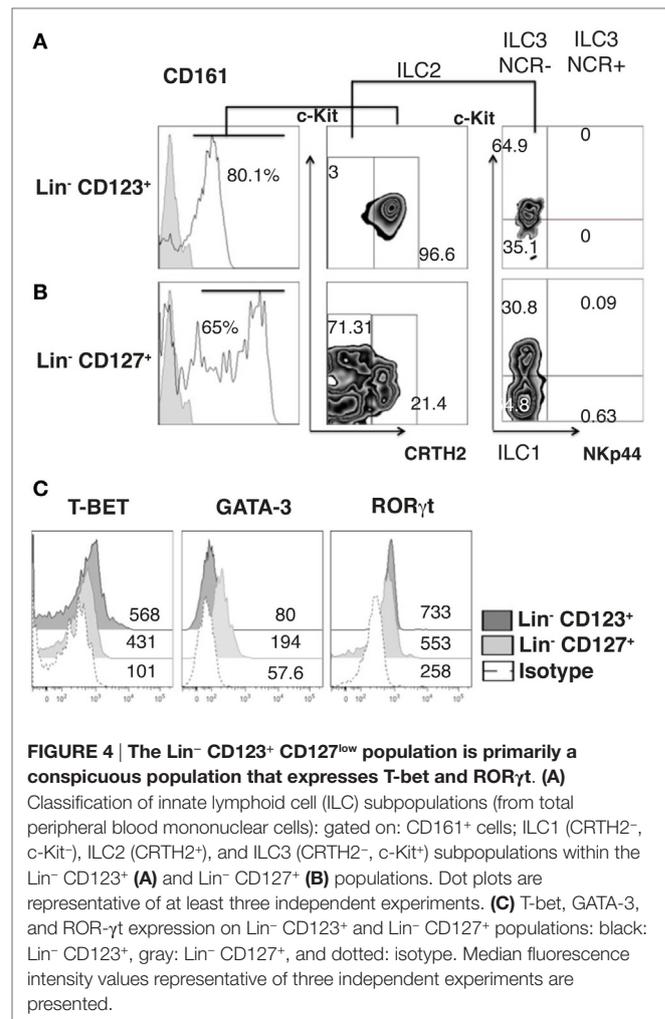
We subsequently isolated the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population from the lymphoid region and CD127⁺ ILC population to evaluate the cytokines in the supernatants via a multiplex assay after activation. Surprisingly, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population produced high levels of IL-8 and low levels of IL-4 (Figure 6A), whereas the CD127⁺ expressed IL-8 and IL-2;

however, other Th type cytokines were not identified in the purified populations (data not shown). The high expression of IL-8 by the CD123⁺ CD127^{low} population was confirmed via intracellular detection in which IL-3 induced the expression of IL-8 (Figure 6C), which was significantly increased in the presence of PMA/Ionomycin (Figures 6B,C). The percentage of IL-8⁺ cells was significantly increased in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} cells compared with the CD127⁺ ILC (Figures 6B,C). The lack of expression of IL-2 and IFN- γ in the isolated Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population was also confirmed via intracellular detection, in which only the expressions of IL-4 and IL-8 (Figure 6D, lower panel) and not IL-2 or IFN- γ were identified (Figure 6D, upper panel). These findings indicate that the freshly isolated steady-state Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population expresses high levels of IL-8 and confirm the limited expression of Th type cytokines.

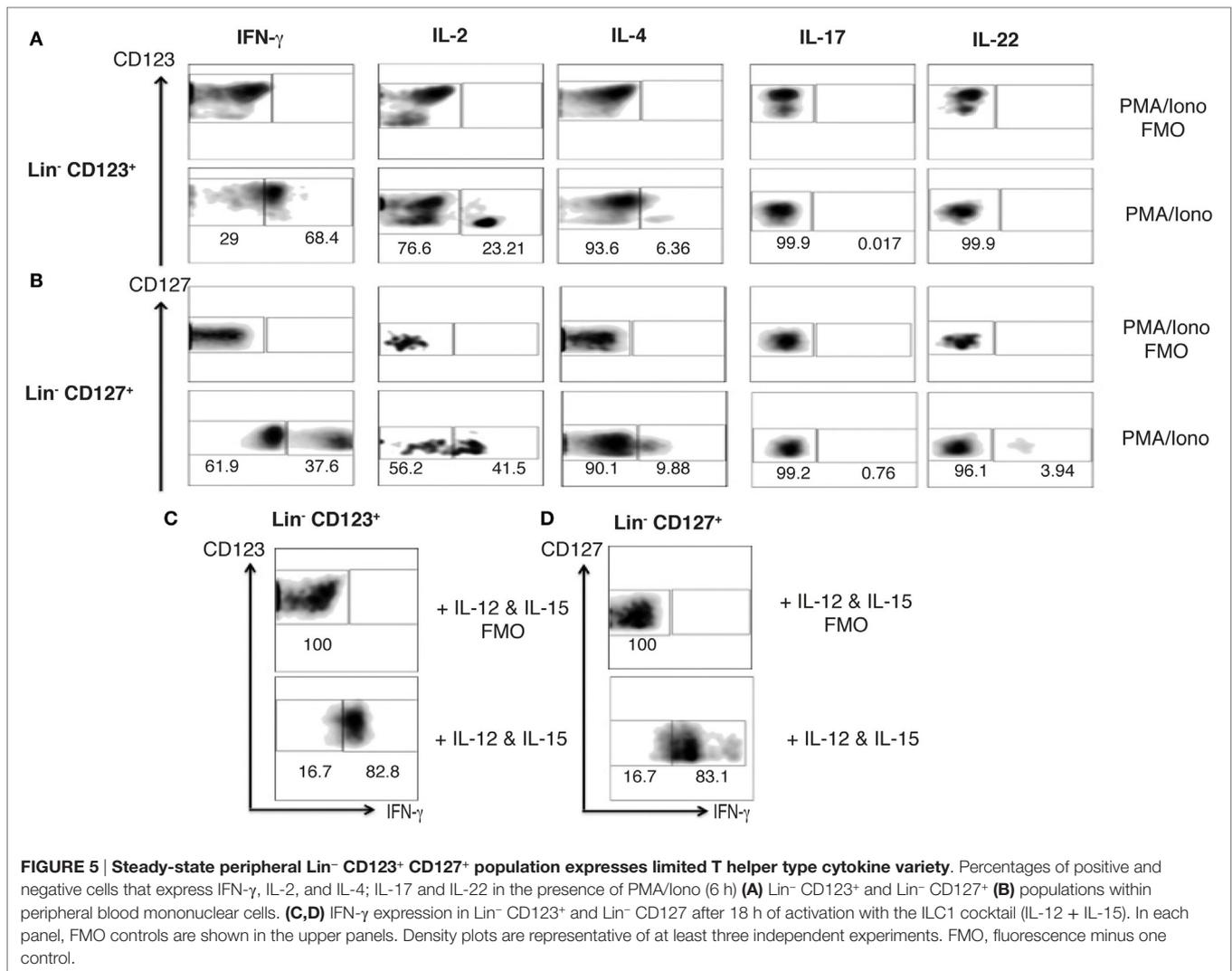


The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} CLA⁺ Population Has Migratory Potential Mediated by SDF-1

Considering the high display of CLA in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population, the expression of other homing receptors was subsequently assessed. **Figure 7A** indicates that the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population exhibited an increased expression of CXCR4 and CD62L compared with the CD127⁺ ILC. In contrast, we identified an increased expression of CCR6 in the CD127⁺ ILC compared with the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} cells (**Figure 7A**). The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}



population from PB highly expresses CXCR4; thus, migration assays were performed with SDF-1, the ligand for CXCR4. As indicated in **Figure 7B**, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population from PB migrates in response to SDF-1. In addition, SDF-1 is present in the skin culture supernatants from CS, and a significant increase in SDF-1 was identified in the inflamed skin cultures obtained from the biopsies of patients with psoriasis (**Figure 7C**). Remarkably, a significantly increased migration in response to supernatants obtained from cell cultures from PS lesion biopsies was dependent on CXCR4-SDF-1 compared with supernatants from the CS (**Figure 7D**). In addition, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} but not the CD127⁺ population transmigrated through activated endothelial, and this migration significantly increased in response to SDF-1 (**Figure 7E**). Interestingly, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population increased the expression of CD127 after contact with activated endothelial cells (Figure S5 in Supplementary Material). These findings indicate the high migratory capability of the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} CLA⁺ population and suggest that under inflammatory conditions, SDF-1 could promote skin infiltration of Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} cells.



The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} Population within the Lymphoid Region Downregulates CD123 and Basophil Markers upon Activation

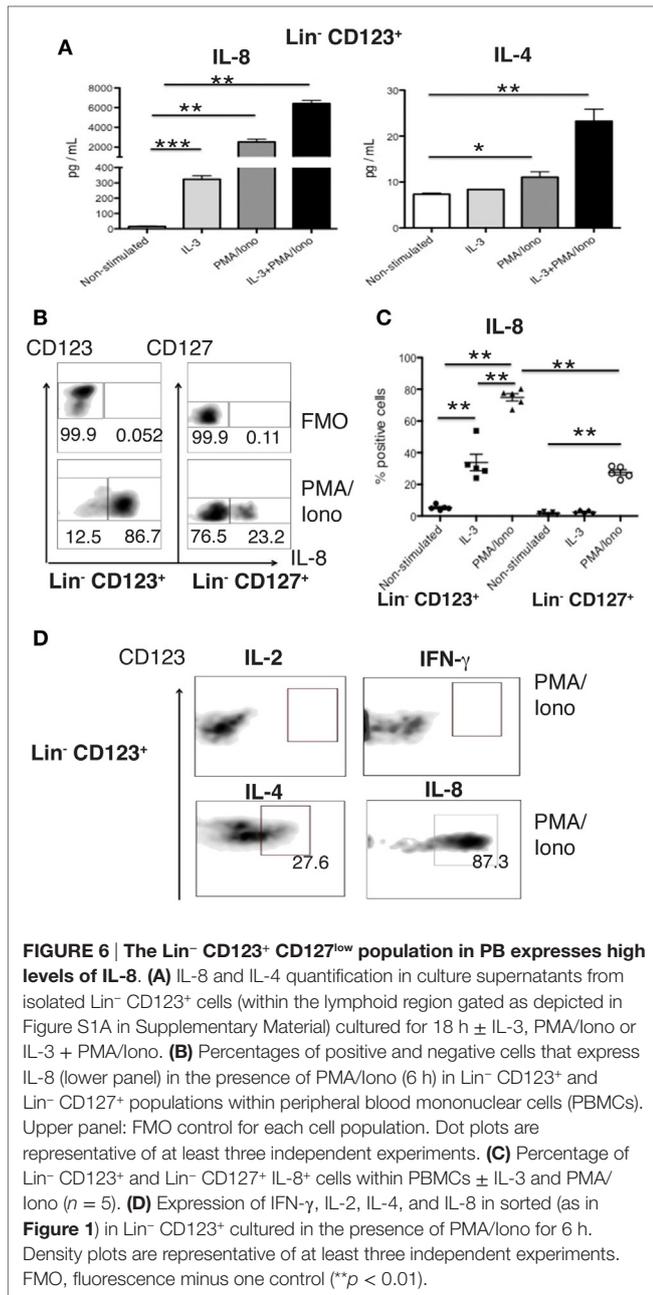
The majority of Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} cells within the lymphoid region downregulates CD123 and basophil markers such as Fc ϵ R, CCR3, and CD203c upon activation. In contrast, most CD123⁺ FSC^{int} SSC^{int} counterparts maintain the expression of these molecules (**Figures 8A–C**).

Considering that a reduction of the antigen recognized by 2D7 has been reported in activated basophils, the expression of IL-8 and 2D7 was evaluated after activation with PMA/Ionomycin and by IgE crosslinking. Remarkably, the population expressing IL-8 is the CD123^{low} and not the one maintaining high expression of CD123. We did not observe IL-8 expression after IgE crosslinking. In contrast, both cell populations reduced the expression of 2D7 in response to PMA/Ionomycin and IgE (**Figure 8D**). These results clearly show important functional differences between the lymphoid Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low}

population and the CD123⁺ FSC^{int} SSC^{int} one, suggesting that the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population from the lymphoid region may require activation to acquire ILC functional features and to diminish basophil activity.

Barrier Tissues, Such As Skin, Are Normally Infiltrated by a Specialized Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} Population with ILC Features

Considering the high expression of CLA in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population and the downregulation of CD123 after activation next, we investigated whether an equivalent CD123⁺ population might be identified in the skin. We found Lin⁻ CD123^{low} and Lin⁻ CD127⁺ cells in the dermis of CS (**Figure 9A**). Notably, in the skin, the Lin⁻ CD123^{low} population exhibited an increased expression of CD127 and CD90 compared with the PB CD123⁺ CD127^{low} population; however, it expressed lower levels of CD132 and CD161. The Lin⁻ CD123^{low} population in skin is positive for c-Kit, CRTH2, AhR, and IL-23 and expresses high



levels of NKp44 compared with the CD127⁺ population. Although similar levels of CLA and CXCR4 are recorded (Figure 9B), the Lin⁻ CD123^{low} population does not express basophil markers such as Fc ϵ R, CCR3, CD203c, or 2D7 (Figure 9C). Surprisingly, among the Lin⁻ CD123^{low} population in the CS, ILC1, ILC2, and ILC3 (NKp44⁺ and NKp44⁻) may be identified by phenotype (Figure 9D). Among the CD127⁺ ILC population, ILC1, ILC2, and ILC3 (NKp44⁺ and NKp44⁻) were also identified (Figure 9E). However, the proportions are different compared with the Lin⁻ CD123^{low} skin population and the PB CD127⁺ ILC, as well as between different CS samples (data not shown). Considering that the Th cytokine production by ILC has mainly

been reported in peripheral tissues, the cytokine production by the CS Lin⁻ CD123^{low} population was subsequently evaluated. After activation, the Lin⁻ CD123^{low} population present in CS expresses IFN- γ , IL-2, and IL-4 and, remarkably, IL-17 and IL-22 (Figure 10A). The CD127⁺ ILC population exhibited a similar pattern of cytokine expression; however, the percentages were different between both populations (Figure 10B) and between different CS biopsies. As a result of the expression of IL-17 and IL-22 after PMA/Ionomycin activation, we subsequently assessed whether the Lin⁻ CD123^{low} population responded to the ILC3 cocktail (IL-1 β , IL-2, and IL-23) in CS. CS was stimulated with the ILC3 cocktail, PMA/Ionomycin or the combination. Figure 10C indicates that the Lin⁻ CD123^{low} population exhibits a minor expression of IL-22 or IL-17 in response to the ILC3 cocktail; however, increases in the percentages of IL-22⁺, IL-17⁺, and both were identified in response to the combination of ILC3 cocktail and PMA/Ionomycin compared with only PMA/Ionomycin. The expression of IL-17 by the skin Lin⁻ CD123^{low} cells and the CD127⁺ populations correlates with the expression of ROR γ t (Figure S6 in Supplementary Material) and with the ILC3 subset phenotype. Regarding the IL-8 expression, we determined that after stimulation, the Lin⁻ CD123^{low} population from CS expressed IL-8 to a lesser extent compared with the PB Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population (Figure 10A). These findings indicate that in accordance with the high expression of CLA in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population from PB and with the downregulation of CD123 after activation, we identified a Lin⁻ CD123^{low} population in CS that exhibit increased phenotypic and Th type cytokine diversity compared with its PB counterpart. These findings strongly suggest that specialized Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} population with ILC features normally infiltrate barrier tissues, such as skin, which appear to be in a late stage of activation.

SDF-1 Dependent Migration of Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} May Precede Activation and Local Production of IL-17 and IL-22 in Psoriasis Patients

As a result of the migratory potential and the ability of the Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} population present in CS to express IL-17 and IL-22, the frequencies and the expression of these cytokines by the ILC-related populations from psoriasis patients were subsequently assessed. Importantly, a significant increase in the frequencies of the Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} population was identified in the skin lesions of psoriasis patients compared with the CS. Interestingly, an increase was also identified in the non-lesioned (NL) skin of psoriasis patients. We also identified an increase in the CD127⁺ population in the NL and lesioned skin from psoriasis patients (Figure 11A). The Lin⁻ CD123^{low} population in the CS expressed IL-17 and IL-22 only after activation. However, in some patients, the Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} population from the lesioned and NL skin expressed IL-17 and IL-22, even in the absence of additional stimulation (Figure 11B). The expression of IL-17 was significantly increased in the skin lesions of the psoriasis patients both in the absence of additional stimulation and after stimulation compared with the unstimulated CS (Figure 11C).

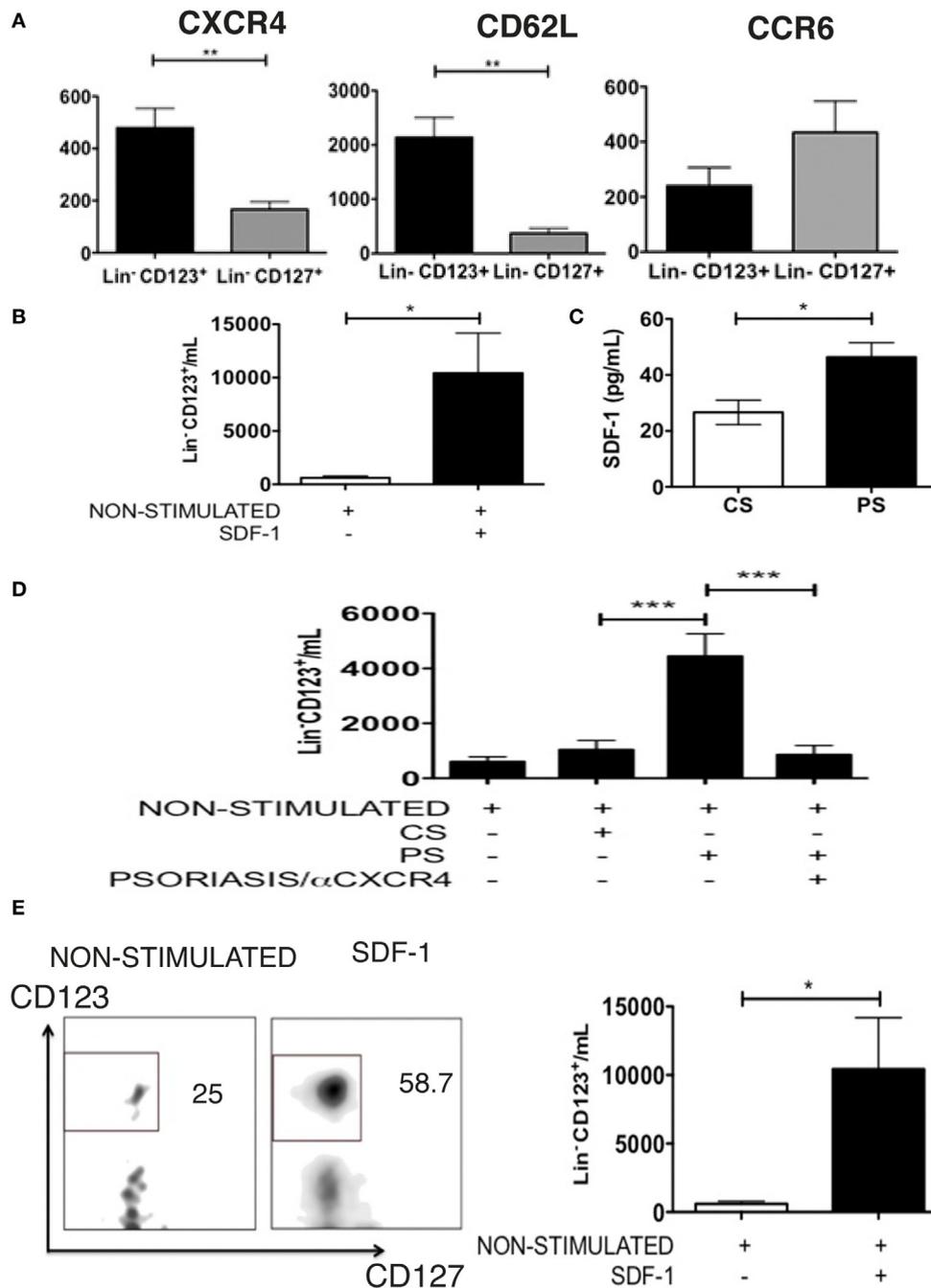
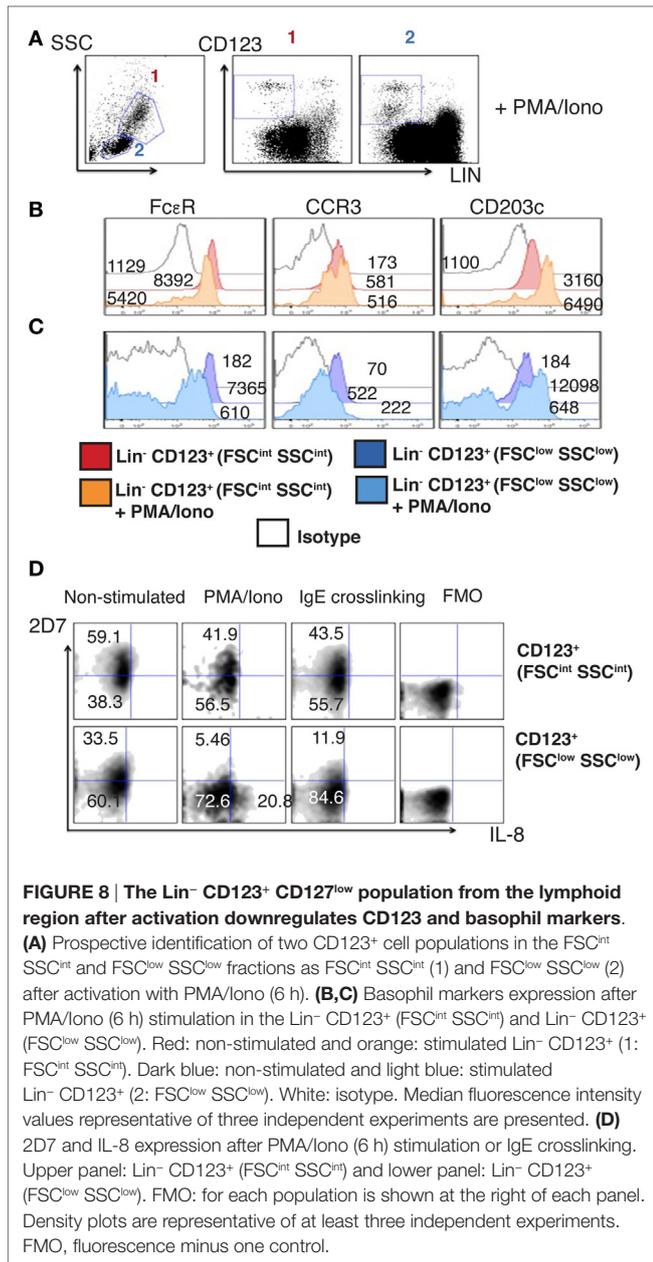


FIGURE 7 | The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} CLA⁺ population has migratory potential mediated by SDF-1. (A) CXCR4 ($N = 6$), CD62L ($N = 5$), and CCR6 ($N = 6$) expression in Lin⁻ CD123⁺ and Lin⁻ CD127⁺ cells from PB of healthy donors; bar graph representation of median fluorescence intensity values ($n = 6$). **(B)** Migration assay of Lin⁻ CD123⁺ [from total peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)] in the presence of SDF-1. **(C)** Amount of SDF-1, quantified by ELISA, in supernatants from control skin (CS) or psoriasis skin (PS) cell cultures. **(D)** Migration assay of Lin⁻ CD123⁺ cells (from total PBMCs) in the presence of supernatants from CS or PS cell cultures \pm blocking anti-CXCR4. **(E)** Transmigration assay of Lin⁻ CD123⁺ cells (from total PBMCs) in the presence of activated endothelial cells and SDF-1 ($N = 10$). Dot plots on the left indicate the percentage of Lin⁻ CD123⁺ migrating cells and are representative of at least three independent experiments ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

The expression of IL-22 in the psoriasis patients was significantly increased after stimulation compared with the non-stimulated CS (Figure 11D). The percentage of cells that expressed IL-22

and notably IL-17 was increased in the Lin⁻ CD123^{low} population compared with the CD127⁺ population (Figures 11C,D). These findings strongly suggest that SDF-1-dependent migration



of Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} cells may precede the activation the downregulation of Lin⁻ CD123 and local production of IL-22 and remarkably IL-17 in psoriasis patients.

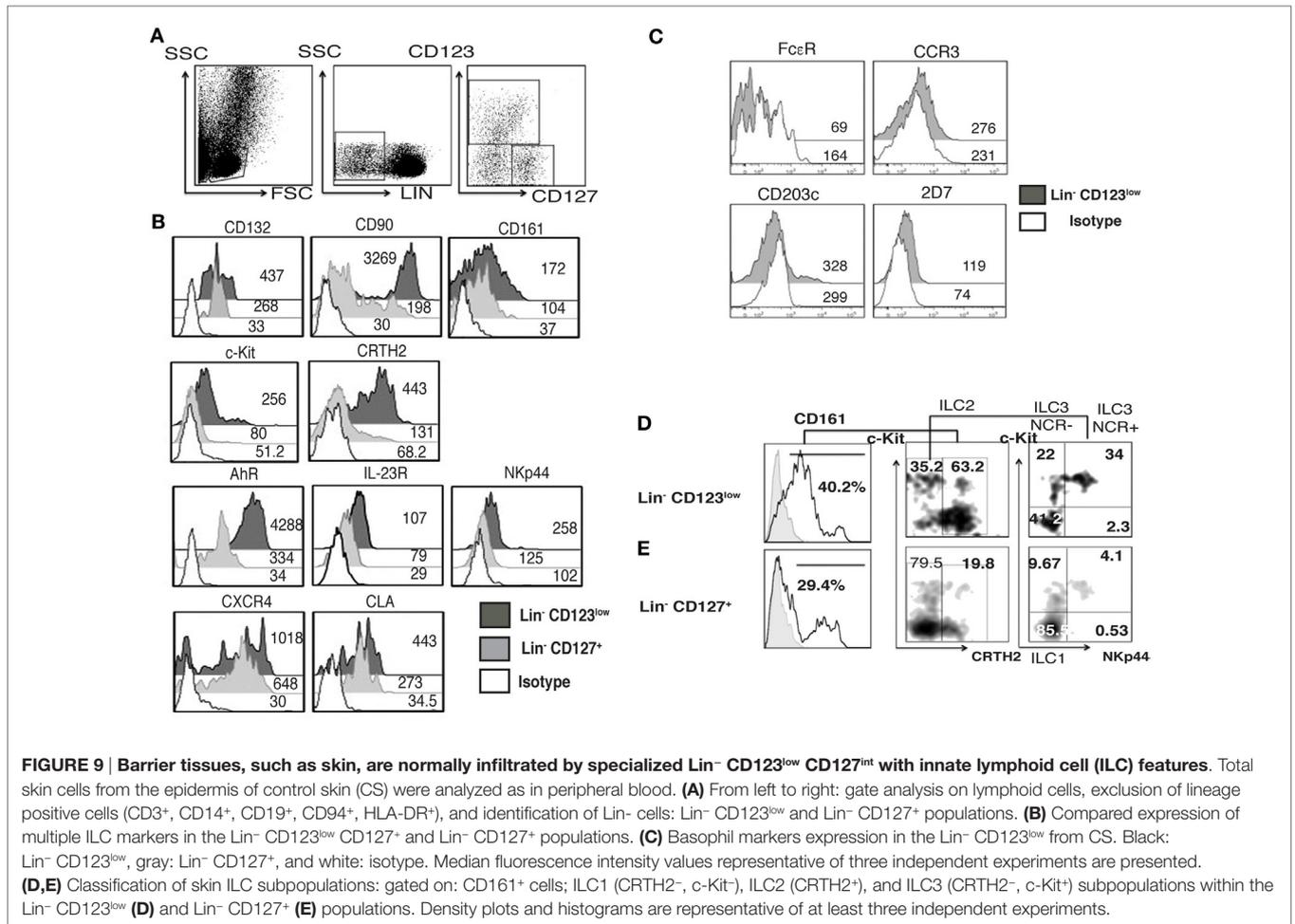
DISCUSSION

In the past years, a high diversity of ILC, including non-classical populations, has been described. Here, we report a Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population in PB that possesses ILC features. Moreover, IL-3 appears to be crucial for its maintenance and identity. The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population highly expresses CLA and has skin-homing potential. Moreover, a similar population CD123^{low} was identified in the skin, which likely participates in the pathogenesis hallmarks of psoriasis.

Recently, different transcription factors have been described as crucial for ILC identity and development. NFIL3, which is regulated by IL-7, is crucial for ILC development (16, 19). Classic ILC express IL-7R α (CD127), although CD123 (IL-3R α) is usually used to exclude basophils during ILC identification; this report identified a Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population that expresses basophil and lymphoid markers but remarkably expresses several ILC features, which appears to be regulated by IL-3.

Classic ILC express CD127 however; recently, it has been reported the presence of non-classical CD127⁻ ILC populations and also an early ILC precursor (EILP) CD127^{low} (8, 9). The Lin⁻ CD123⁺ population we report here shows lymphoid morphology and expresses low levels of CD127. However, to explore the lymphoid origin of such population, we evaluated unproductive DJ rearrangements as a molecular fingerprint of early lymphoid progenitors. There were no apparent rearrangements neither in the CD127⁺ classical ILC nor in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population when compared with B-lymphocytes or in the acute B cell leukemia cell line NAL-M6. Nevertheless, the human ILC progenitor has only been described in tissues (46) and not in bone marrow or PB. Therefore, until now, the molecular features of the human ILC precursor are unknown. As an alternative to determine the lymphoid origin, the expression of CD7 was evaluated. Importantly, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population expressed CD7, which has been reported to be expressed in the CLP and maintained in different lymphoid populations (3). Co-expression of CD127 and CD7 in the Lin⁻ CD123⁺ population suggests lymphoid-related features. However, future studies are necessary to formally prove the lymphoid origin of this population.

CD123 is normally used to exclude pDCs, basophils, and mast cells when identifying ILC. However, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population showed clear differences in the expression of MHC-II, BDCA-4, and BDCA-2 compared to pDCs. With regard to mast cell similarities, the low abundance of mast cells in PB under normal conditions suggest that the CD123⁺ CD127^{low} population are not mast cells or their precursors, as they did not expressed CD34 (35). Nevertheless, in this report, we identified a mixture of lymphocyte-sized cells with no segmented nuclei (no lobes) and cells with classical basophil morphology (lobed nuclei). In addition, two populations of Lin⁻ CD123⁺ cells were observed, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population from the lymphoid region (FSC^{low}/SSC^{low}) and an FSC^{int} SSC^{int} CD123⁺ population. The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} CD7^{low} population from the lymphoid region expresses similar levels of the basophil markers Fc ϵ R and CCR3, compared to the CD123⁺ FSC^{int} SSC^{int} region. However, it expresses lower levels of CD203c and of the antigen recognized by mAb 2D7, which is expressed in basophil granules, indicating the expression of less granules in this population (43). Our results show then, a distinct Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population within the lymphoid region with ILC properties that transiently share some features with CD123⁺ basophils from the FSC^{int} SSC^{int} region. Importantly, such population decreases the expression of basophil markers upon activation, whereas most CD123⁺ cells from the FSC^{int} SSC^{int} region maintains the expression of CD123 and show more stable basophil marker display after activation. Of special interest for our future investigations, subfractioning the two subsets described in this study will be highly relevant



for further transcriptional analyses at the clonal level. Whether basophils and the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population develop from a common progenitor, or their shared phenotypic properties only resemble the phenomenon referred to as lineage priming where “promiscuous expression of several lineage-affiliated genes precedes lineage commitment but does not alter the biological potential” as described for some oligo- or bipotential precursors (47), is still a matter in question.

Remarkably, in this report, several evidences support the finding that the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} from the lymphoid region population possesses several ILC features. First, the expression of low levels of CD127 by protein and mRNA. Second, the observed expression of CD7, which is related to CLP and maintained in different lymphoid cells, including the classical ILC. Third, the high expression of CD132, which has been reported as crucial for ILC development (48). Fourth, the expression of CD90, a classical ILC marker as well as other ILC markers such as CD161, $\alpha 4$ integrin which has been described in ILC precursors, and the expression of c-Kit, CRTH2, AhR, IL-23R, and CCR6. Fifth, the expression of several transcription factors such as Id2, NFIL3, TOX, PLZF described for ILC identification in humans (16, 17, 34) and TCF-1, recently described for ILC development in mice (15, 49), and sixth, the increase in NFIL3, TOX, and PLZF

expression by IL-3 suggesting that NFIL3 might regulate the identity of the ILC-related features in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population. Thus, our data indicate that the use of anti-FcεR and anti-CD123 in the lineage cocktail in previous reports may have limited the identification of an alternative population with ILC features in PB.

In human PB, classical ILC express CD161 and exhibit phenotypic diversity (ILC1, ILC2, and ILC3 NKp44⁻). Interestingly, the PB Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population comprises a majority conspicuous population (CD161^{low}, c-Kit⁺, and CRTH2⁺), which, by phenotype, is similar to ILC2 and a minority of ILC1 and ILC3 populations. This finding was inconsistent with the low expression of GATA-3 and the expression of T-bet and ROR γ t. GATA-3 has been reported as crucial for classical ILC development (50, 51). Moreover, it has recently been reported that a common ILC progenitor ROR γ t⁺ present in secondary lymphoid tissue has the potential *in vitro* to give rise to all human ILC subpopulations (46). These findings support the idea that the expression of ROR γ t in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population in PB may be related to a further process of differentiation and diversification of this population in peripheral tissues. In contrast, in the classical CD127⁺ ILC population in PB, similar to other reports (39–41), ILC1, 2, and 3, as well as the expression of T-bet, ROR γ t, and GATA-3,

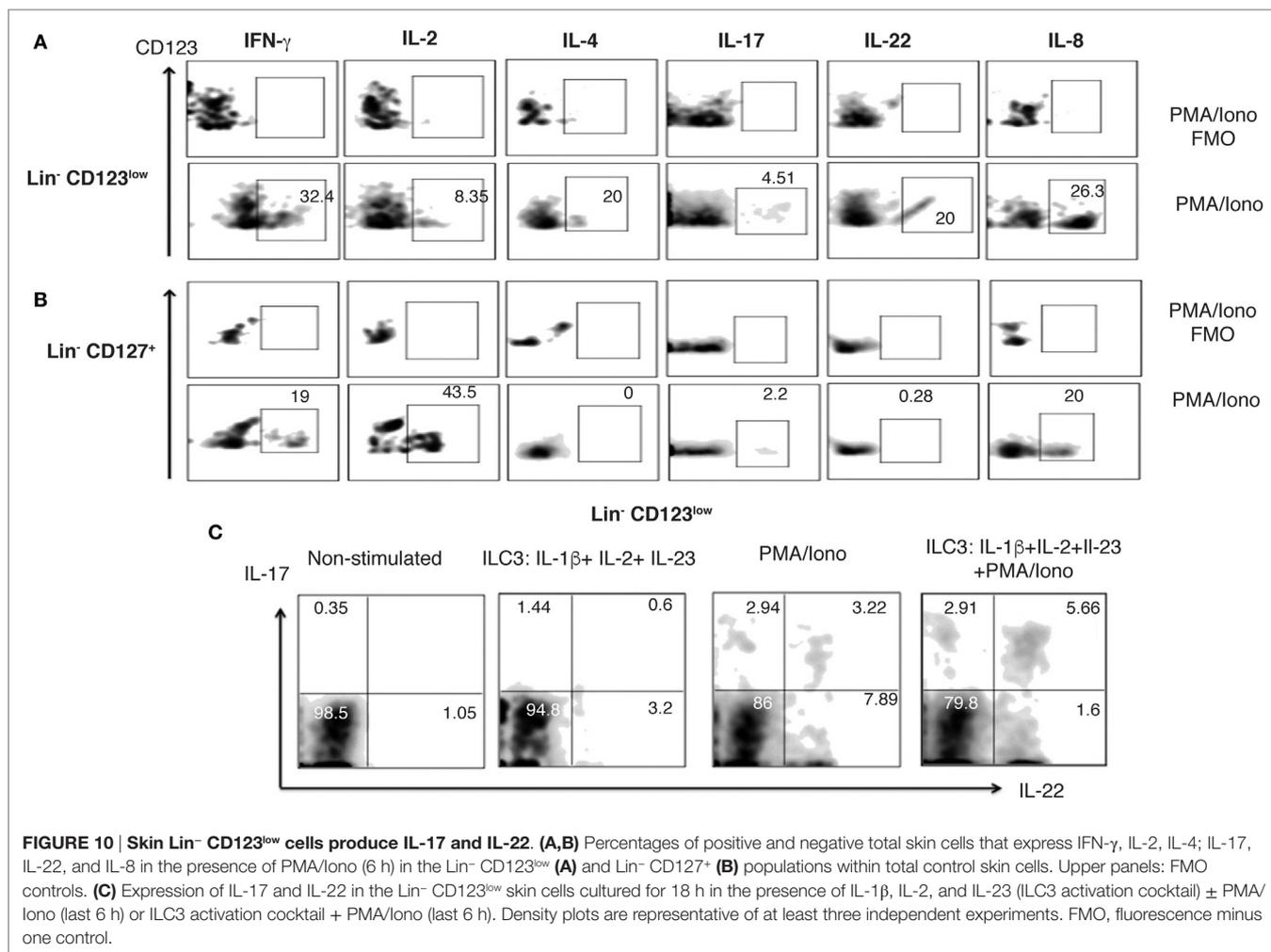


FIGURE 10 | Skin Lin⁻ CD123^{low} cells produce IL-17 and IL-22. (A,B) Percentages of positive and negative total skin cells that express IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-17, IL-22, and IL-8 in the presence of PMA/Iono (6 h) in the Lin⁻ CD123^{low} (A) and Lin⁻ CD127⁺ (B) populations within total control skin cells. Upper panels: FMO controls. (C) Expression of IL-17 and IL-22 in the Lin⁻ CD123^{low} skin cells cultured for 18 h in the presence of IL-1 β , IL-2, and IL-23 (ILC3 activation cocktail) \pm PMA/Iono (last 6 h) or ILC3 activation cocktail + PMA/Iono (last 6 h). Density plots are representative of at least three independent experiments. FMO, fluorescence minus one control.

were identified. These findings indicate that both populations share several ILC features; however, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population in PB may be in a different stage of differentiation and it may require different transcriptional factors and cytokines for development.

It has been reported that ILC express cytokines similar to the Th lymphocytes in peripheral tissues (4, 52). However, there are few reports in PB and most of the studies use cell lines derived from ILC obtained from patients (7, 39, 40). The freshly isolated Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population expresses only IL-4 after activation and the classical CD127⁺ population expresses IL-2 (data not shown). However, among the total PBMCs, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} and the classic CD127⁺ ILC populations expressed IFN- γ in response to PMA/Ionomycin and the ILC1 activation cocktail. However, even in the presence of IL-1 β , IL-2, and IL-23, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} and CD127⁺ ILC did not express IL-17 or IL-22, which indicates that steady-state PB ILC populations may require further differentiation or activation to express all Th type varieties of cytokines. Importantly, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population highly expresses IL-8 compared with the classical CD127⁺ ILC, notwithstanding that IL-8 expression by ILC has only been assessed in a limited

number of reports (6, 53), and the function of this cytokine expression in PB ILC has not been investigated. Interestingly, the population that expresses cytokines after activation shows a downregulation of CD123, therefore further examination of the phenotype and function of the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population after activation was evaluated. Interestingly, the population downregulating CD123 expresses IL-8 and decreases the expression of basophil markers, including 2D7. Of note, these effects were not observed in the population that maintains the CD123 expression or after IgE crosslinking. However, upon IgE activation, an important decrease in the 2D7 expression was observed in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population, suggesting the activity of this population in response to IgE. These results suggest that activation of the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} cells may precede their capability of acquiring ILC function and diminishes basophil activity.

In mouse models, it has been proposed that the complete differentiation of ILC occurs in peripheral tissues (15, 49). In human tonsils, the identification of an ILC3 subpopulation that presents a “naïve” phenotype has been recently described; these cells were unresponsive to IL-23 and IL-1 β , despite their expression of IL23R and IL1R1 transcripts, and were characterized

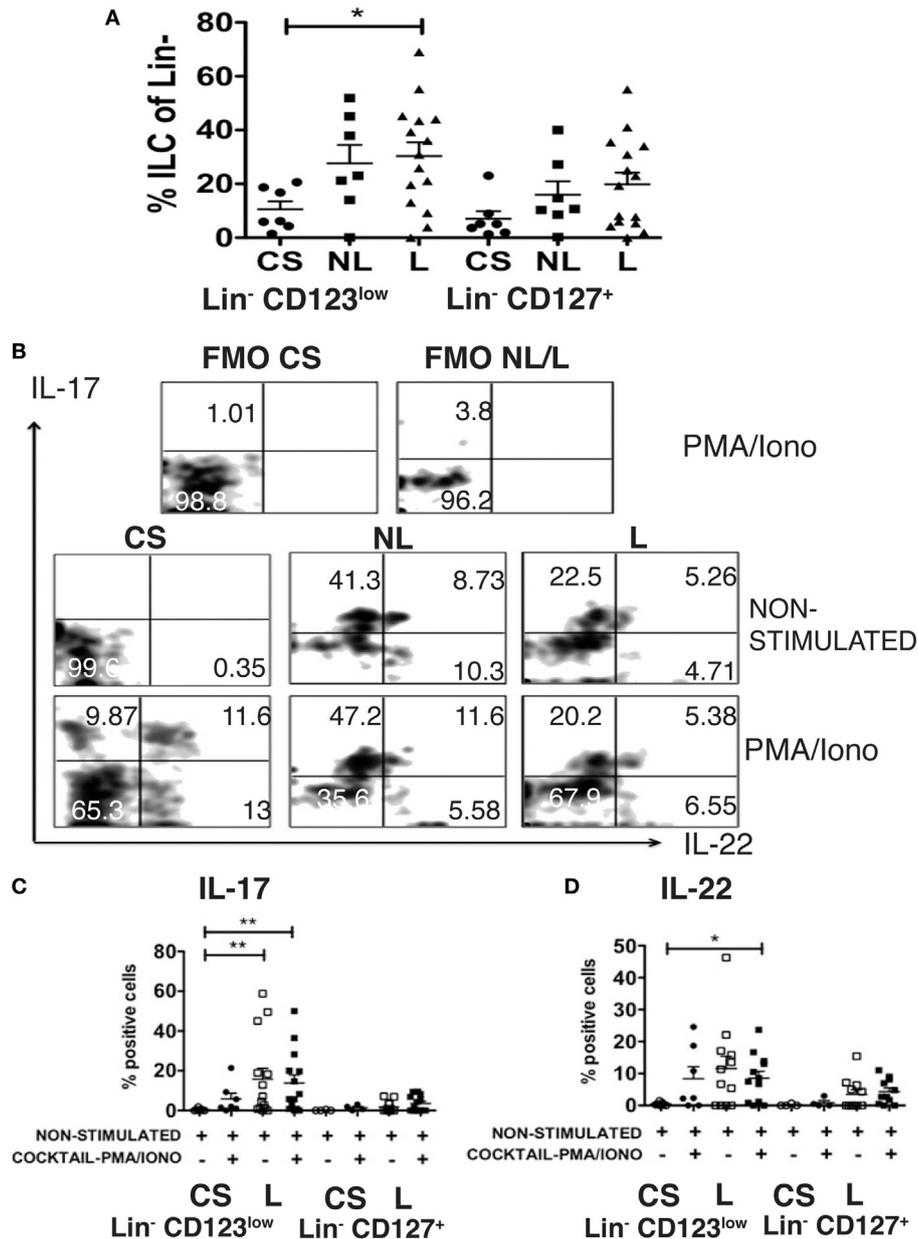


FIGURE 11 | SDF-1-dependent migration of Lin⁻ CD123^{low} CD127^{low} cells may precede activation and local production of IL-17 and IL-22 in psoriasis patients. (A) Frequencies of Lin⁻ CD123^{low} and Lin⁻ CD127⁺ populations in control skin (CS) $N = 7$, non-lesioned (NL) skin $N = 7$, and lesioned (L) $N = 15$ skin from psoriasis patients. **(B)** Intracellular expression of IL-17 and IL-22 in Lin⁻ CD123^{low} cells from CS, NL and L skin cultured during 18 h \pm IL-1 β , IL-2, and IL-23 (ILC3 activation cocktail) \pm PMA/Iono (last 6 h). Dot plots are representative of at least three independent experiments. FMO, fluorescence minus one control. **(C,D)** Percentages of skin IL-17⁺ and IL-22⁺ Lin⁻ CD123^{low} cells (CS: $N = 7$ and L: $N = 12$) or Lin⁻ CD127⁺ cells (CS: $N = 4$ and L: $N = 11$) cultured during 18 h \pm IL-2, IL-23, and IL-1 β (ILC3 activation cocktail) + PMA/Iono (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

by the expression of CD62L and CD45RA (23). Our findings demonstrated that the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population in PB has limited Th cytokine production and highly expresses homing molecules (CLA, CXCR4, and CD62L) and also a IL23R and AhR, which, in addition to the expression of ROR γ t, suggests that this population may be in an early stage of differentiation with the potential to migrate into different tissues to be fully differentiated.

Importantly, an equivalent of the CD123⁺ population was present in the CS that expresses several ILC features (CD127^{int}, CD132, CD90, c-Kit, CRTH2, AhR, IL-23R, NKp44, and CCR6), where an increased phenotypic diversity (ILC1, ILC2, and ILC3) was also identified. Consistent with this diversity, more Th type cytokines, including IL-22 and remarkably IL-17, were identified in the skin Lin⁻ CD123⁺ population after activation.

The expression of IL-22 and IL-17 was consistent with the high expression of IL-23 and AhR (54) in the Lin⁻ CD123^{low} population. This finding suggests that in peripheral tissues, this population may express a wider variety of cytokines as reported for other ILC subsets (24, 28). These findings also support that in the skin, the CD123⁺ population becomes fully differentiated, as proposed in the mouse model for the classical ILC subsets (15, 55). The cytokine expression by the direct isolated skin ILC was not evaluated; therefore, it is possible that other activated cells in the skin cultures may contribute to the cytokine expression by the Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} population, like has been described for ILC2 in skin (56). Remarkably, the Lin⁻ CD123^{low} population in skin expresses IL-8, which may be relevant in the recruitment of other innate cells, such as neutrophils (57). Similar to the PB, the CD123⁺ population in the skin is more frequent than the classical CD127⁺ ILC. Therefore, it is possible that the high expression of CLA may be involved in non-inflammatory skin homing as reported for T cells (58) and ILC, in which CLA expression in ILC2 and ILC3 is sufficient to identify cells with potential to migrate into the skin (39, 40). Our findings suggest that the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} CLA⁺ population identified in PB may represent a steady-state reservoir with the potential to migrate into the skin, mediated by CLA, and suggest that barrier tissues, such as skin, are normally infiltrated by specialized Lin⁻ CD123^{low} CD127^{int} populations with ILC-related features.

In addition, we demonstrated that the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population transmigrates in response to SDF-1 and in the presence of activated endothelial cells mediated by SDF-1. Similar to other reports (59, 60) and other inflammatory diseases (61), an increase in the levels of SDF-1 in the supernatants of psoriasis patients was identified; this finding suggests that the CXCR4/SDF-1-dependent migration is an additional migration mechanism, which may be relevant during inflammatory conditions, such as psoriasis. A CCR10–CCL27 interaction has been proposed as a mechanism for homeostatic skin migration. However, in mouse models of inflammation, a decrease in the number of CCR10⁺ ILC in the skin has been reported (62), in addition to a decreased expression of CCL27 in psoriasis (63). In this report, we propose that CXCR4–SDF-1 is an alternative mechanism in psoriasis (and inflammatory conditions), which may explain the presence of ILC and cytokine production in psoriasis patients even in the absence of CCL27.

Importantly, both the Lin⁻ CD123^{low} and CD127⁺ populations were increased in the skin of psoriasis patients; however, it is possible that the CD127⁺ ILC may migrate by a mechanism independent of CXCR4/SDF-1 but CCR6-dependent because high levels of CCR6 were identified in the CD127⁺ ILC population. Remarkably, both populations express IL-22 and IL-17 in the skin of psoriasis patients and represent two hallmark cytokines in the immunopathology of psoriasis in mouse models and humans (64–66). The expression of these cytokines was increased in the Lin⁻ CD123^{low} population compared with the CD127⁺ ILC. It has been reported that a CD3⁻ population expresses IL-17 in the PB and skin of psoriasis patients (41). However, there is only one report of a slight production of IL-17 by classic NCR⁺ ILC3 from the skin of psoriasis patients (40). Our findings indicate that the Lin⁻ CD123^{low} population may be an important and additional

innate source of IL-22 and, importantly, IL-17 in the lesioned and probably in the NL skin of psoriasis patients. In addition, our findings suggest that the SDF-1-dependent migration of Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} cells from the PB to the skin may precede the activation and local production of IL-17 and IL-22 in psoriasis patients.

In summary, according to the proposed model (Figure 12), we have identified in PB a novel Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population with a mixture of lymphoid (CD127^{low} CD7^{low}) and basophil (FcεR, CCR3, CD203^{int} 2D7^{low}) properties that possesses several ILC features, including the phenotype Id2⁺ NFIL3⁺ PLZF⁺ TOX⁺ TCF-1⁺ CD132⁺ CD90⁺ CD161⁺α4 integrin⁺ c-Kit⁺ CRTH2⁺AhR⁺IL-23R⁺ CCR6⁺, and high migratory capabilities. IL-3 appears to comprise a crucial growth factor for survival of

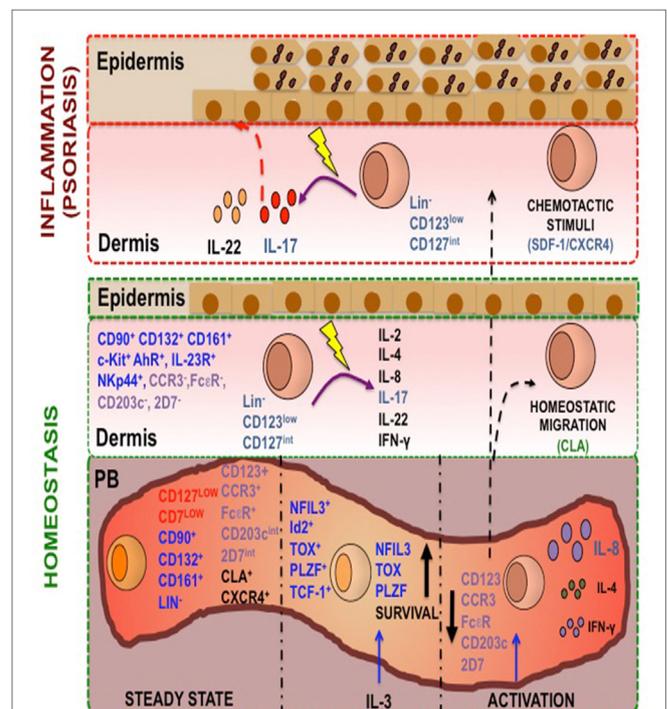


FIGURE 12 | A human Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} endowed with innate lymphoid cells (ILC) features and migratory capabilities contributes to immunopathological hallmarks of psoriasis. Peripheral blood (PB) contains a Lin⁻ CD123⁺ population with a mixture lymphoid (in red: CD127^{low} CD7^{low}) and basophil markers expression (in purple: FcεR, CCR3, CD203^{int} 2D7^{low}) and is endowed with high migratory capabilities [cutaneous lymphocyte antigen (CLA) and CXCR4]. In steady state, this population possesses several ILC features (in blue: Lin⁻, CD132⁺, CD90⁺, CD161⁺, NFIL3⁺, TCF-1⁺, Id2⁺, TOX⁺, PLZF⁺) and after activation with IL-3 increase this features. This population after PMA/Iono treatment downregulates CD123, is able to produce IL-8, IL-4, and IL-2, and diminish the basophil markers. A similar but specialized CD123^{low} population normally infiltrates barrier tissues, such as skin. We propose that CXCR4–SDF-1 is an important skin-homing mechanism under inflammatory conditions, particularly in psoriasis. The increase of the CD123^{low} population in the non-lesioned and lesioned skin of psoriasis patients supports its high migratory potential. Remarkably, the expression of IL-22 and particularly IL-17 by the CD123^{low} population in the skin of psoriasis patients strongly suggests that this population may contribute to the immunopathological hallmarks of a skin disease such as psoriasis.

the ILC-related features in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population. A similar but specialized Lin⁻ CD123^{low} population normally infiltrates barrier tissues, such as skin. We propose that CXCR4/SDF-1 is an important skin-homing mechanism under inflammatory conditions in psoriasis. The increase of the Lin⁻ CD123^{low} population in the NL and lesioned skin of psoriasis patients supports its high migratory potential. Remarkably, expression of IL-22 and particularly IL-17 by the Lin⁻ CD123^{low} population in the skin of psoriasis patients strongly suggests that this population may contribute to the immunopathological hallmarks of a skin disease such as psoriasis.

ETHICS STATEMENT

The study was approved by the local ethic committee from the Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua Registry number: 112/2016 and by the ethic committee for Health Research from Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (committee number:3601). The study was conducted according to the principles detailed in the Declaration of Helsinki. All participants signed an informed consent form.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LB conceived and directed the project. LB, LM-V, and OC-E designed the experiments. LM-V, OC-E, AM, CA-F, and MV-A performed the experiments. LM-V and OC-E acquired and analyzed the data. LB and RP contributed reagents/materials/analysis tools. LB, LM-V, and RP wrote the manuscript. CM-G and FJ-S were involved in the recruitment and diagnosis of psoriasis patients. EF-O provided the control skin biopsies. M-TL

realized the Quantitative RT-PCR and JM-B and JT-S realized the incomplete DH-JH rearrangements analysis. All the authors reviewed critically the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all of our patients for their invaluable cooperation. We would also like to acknowledge Dr. Genaro Patiño from Hospital Infantil de México “Federico Gómez” for his assistance with the confocal microscopy analysis, to Humberto Valdovinos-Torres from the Instituto Nacional de Salud Pública for his technical support, and we thank the Flow Cytometry core facility from “Coordinación de Investigación en Salud” at “Centro Médico Nacional Siglo XXI” of IMSS for instrumentation and Jessica Prieto-Chávez for her technical support.

FUNDING

This study was funded by *Instituto Mexicano del Seguro Social* (R-2008-3601-62-FIS/IMSS/PROT/G11/939). LM-V and OC-E are doctoral students from Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM and received fellowship 262112 and 267839, respectively, from the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)* in Mexico.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00176/full#supplementary-material>.

REFERENCES

- Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol* (2012) 30:647–75. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075053
- Hazenbergh MD, Spits H. Human innate lymphoid cells. *Blood* (2014) 124:700–9. doi:10.1182/blood-2013-11-427781
- Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* (2006) 24:287–320. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090612
- Kumar V. Innate lymphoid cells: new paradigm in immunology of inflammation. *Immunol Lett* (2013) 157:23–37. doi:10.1016/j.imlet.2013.11.003
- Diefenbach A, Colonna M, Koyasu S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity* (2014) 41:354–65. doi:10.1016/j.immuni.2014.09.005
- Mjösberg J, Bernink J, Golebski K, Karrich JJ, Peters CP, Blom B, et al. The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* (2012) 37:649–59. doi:10.1016/j.immuni.2012.08.015
- Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol* (2011) 12:1055–62. doi:10.1038/ni.2104
- Dadi S, Chhangawala S, Whitlock BM, Franklin RA, Luo CT, Oh SA, et al. Cancer immunosurveillance by tissue-resident innate lymphoid cells and innate-like T cells. *Cell* (2016) 164:365–77. doi:10.1016/j.cell.2016.01.002
- Yang Q, Li F, Harly C, Xing S, Ye L, Xia X, et al. TCF-1 upregulation identifies early innate lymphoid progenitors in the bone marrow. *Nat Immunol* (2015) 16:1044–50. doi:10.1038/ni.3248
- Klose CSN, Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol* (2016) 17:765–74. doi:10.1038/ni.3489
- Satoh-Takayama N, Serafini N, Verrier T, Rekiki A, Renaud JC, Frankel G, et al. The chemokine receptor CXCR6 controls the functional topography of interleukin-22 producing intestinal innate lymphoid cells. *Immunity* (2014) 41:776–88. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.007
- Ishizuka IE, Constantinides MG, Gudjonson H, Bendelac A. The innate lymphoid cell precursor. *Annu Rev Immunol* (2016) 34:299–316. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055549
- Klose CSN, Flach M, Möhle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* (2014) 157:340–56. doi:10.1016/j.cell.2014.03.030
- Verykokakis M, Zook EC, Kee BL. ID'ing innate and innate-like lymphoid cells. *Immunol Rev* (2014) 261:177–97. doi:10.1111/imr.12203
- Serafini N, Voshchenrich CA, Di Santo JP. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat Rev Immunol* (2015) 15:415–28. doi:10.1038/nri3855
- Seehus CR, Aliahmad P, de la Torre B, Iliev ID, Spurka L, Funari VA, et al. The development of innate lymphoid cells requires TOX-dependent generation of a common innate lymphoid cell progenitor. *Nat Immunol* (2015) 16:599–608. doi:10.1038/ni.3168
- Constantinides MG, McDonald BD, Verhoeve PA, Bendelac A. A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature* (2014) 508:397–401. doi:10.1038/nature13047
- Seillet C, Mielke LA, Amann-Zalcenstein DB, Su S, Gao J, Almeida FF, et al. Deciphering the innate lymphoid cell transcriptional program. *Cell Rep* (2016) 17:436–47. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.025

19. Xu W, Domingues RG, Fonseca-Pereira D, Ferreira M, Ribeiro H, Lopez-Lastra S, et al. NFIL3 orchestrates the emergence of common helper innate lymphoid cell precursors. *Cell Rep* (2015) 10:2043–54. doi:10.1016/j.celrep.2015.02.057
20. Juelke K, Romagnani C. Differentiation of human innate lymphoid cells (ILCs). *Curr Opin Immunol* (2016) 38:75–85. doi:10.1016/j.coi.2015.11.005
21. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, te Velde AA, Meijer SL, Weijer K, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol* (2013) 14:221–9. doi:10.1038/ni.2534
22. Montaldo E, Teixeira-Alves LG, Glatzer T, Durek P, Stervbo U, Hamann W, et al. Human ROR γ t+CD34+ cells are lineage-specified progenitors of group 3 ROR γ t+ innate lymphoid cells. *Immunity* (2014) 41:988–1000. doi:10.1016/j.immuni.2014.11.010
23. Björklund ÅK, Forkel M, Picelli S, Konya V, Theorell J, Friberg D, et al. The heterogeneity of human CD127(+) innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol* (2016) 17:451–60. doi:10.1038/ni.3368
24. Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie AN. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. *Science* (2015) 348:1–8. doi:10.1126/science.aaa6566
25. Eberl G, Di Santo JP, Vivier E. The brave new world of innate lymphoid cells. *Nat Immunol* (2014) 16:1–5. doi:10.1038/ni.3059
26. Crellin NK, Trifari S, Kaplan CD, Cupedo T, Spits H. Human NKp44+IL-22+ cells and LT α -like cells constitute a stable RORC+ lineage distinct from conventional natural killer cells. *J Exp Med* (2010) 207:281–90. doi:10.1084/jem.20091509
27. Roan F, Stoklasek TA, Whalen E, Molitor JA, Bluestone JA, Buckner JH, et al. CD4+ group 1 innate lymphoid cells (ILC) form a functionally distinct ILC subset that is increased in systemic sclerosis. *J Immunol* (2016) 196:2051–62. doi:10.4049/jimmunol.1501491
28. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* (2015) 517:293–301. doi:10.1038/nature14189
29. Abt MC, Lewis BB, Caballero S, Xiong H, Carter RA, Susac B, et al. Innate immune defenses mediated by two ILC subsets are critical for protection against acute *Clostridium difficile* infection. *Cell Host Microbe* (2015) 18:27–37. doi:10.1016/j.chom.2015.06.011
30. Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, Denning TL, et al. Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science* (2014) 346:861–5. doi:10.1126/science.1256999
31. Klooverpris HN, Kazer SW, Mjösberg J, Mabuka JM, Wellmann A, Ndhlovu Z, et al. Innate lymphoid cells are depleted irreversibly during acute HIV-infection in the absence of viral suppression. *Immunity* (2016) 44:391–405. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.006
32. Gil-Cruz C, Perez-Shibayama C, Onder L, Chai Q, Cupovic J, Cheng H-W, et al. Fibroblastic reticular cells regulate intestinal inflammation via IL-15-mediated control of group 1 ILCs. *Nat Immunol* (2016) 17:1388–96. doi:10.1038/ni.3566
33. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med* (2015) 21:698–708. doi:10.1038/nm.3892
34. Rivas Bejarano JJ, Valdecantos WC. Psoriasis as autoinflammatory disease. *Dermatol Clin* (2013) 31:445–60. doi:10.1016/j.det.2013.04.009
35. Hedrich CM. Shaping the spectrum – from autoinflammation to autoimmunity. *Clin Immunol* (2016) 165:21–8. doi:10.1016/j.clim.2016.03.002
36. GuryBenari M, Thaïss CA, Serafini N, Di Santo JP, Elinav E, Correspondence IA, et al. The spectrum and regulatory landscape of intestinal innate lymphoid cells are shaped by the microbiome. *Cell* (2016) 166:116. doi:10.1016/j.cell.2016.07.043
37. Pearson C, Uhlig HH, Powrie F. Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut. *Trends Immunol* (2012) 33:289–96. doi:10.1016/j.it.2012.04.004
38. Kim CH, Hashimoto-Hill S, Kim M. Migration and tissue tropism of innate lymphoid cells. *Trends Immunol* (2016) 37:68–79. doi:10.1016/j.it.2015.11.003
39. Munneke J, Björklund A. Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft versus host disease. *Blood* (2014) 124:812–21. doi:10.1182/blood-2013-11-536888.The
40. Teunissen MB, Munneke JM, Bernink JH, Spuls PI, Res PC, Te Velde A, et al. Composition of innate lymphoid cell subsets in the human skin: enrichment of NCR(+) ILC3 in lesional skin and blood of psoriasis patients. *J Invest Dermatol* (2014) 134:2351–60. doi:10.1038/jid.2014.146
41. Villanova F, Flutter B, Tosi I, Grys K, Sreeneebus H, Perera GK, et al. Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis. *J Invest Dermatol* (2014) 134:984–91. doi:10.1038/jid.2013.477
42. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* (2003) 17:2257–317. doi:10.1038/sj.leu.2403202
43. Kepley CL, Craig SS, Schwartz LB. Identification and partial characterization of a unique marker for human basophils. *J Immunol* (1995) 154:6548–55.
44. Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells – how did we miss them? *Nat Rev Immunol* (2013) 13:75–87. doi:10.1038/nri3349
45. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* (2013) 13:145–9. doi:10.1038/nri3365
46. Scoville SD, Mundy-Bosse BL, Zhang MH, Chen L, Zhang X, Keller KA, et al. A progenitor cell expressing transcription factor ROR γ t generates all human innate lymphoid cell subsets. *Immunity* (2016) 44:1140–50. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.007
47. Miyamoto T, Akashi K. Lineage promiscuous expression of transcription factors in normal hematopoiesis. *Int J Hematol* (2005) 81:361–7. doi:10.1532/IJH97.05003
48. Kim BS, Siracusa MC, Saenz SA, Noti M, Monticelli LA, Sonnenberg GF, et al. TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Sci Transl Med* (2013) 5:170ra16. doi:10.1126/scitranslmed.3005374
49. Yang Q, Bhandoola A. The development of adult innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol* (2016) 39:114–20. doi:10.1016/j.coi.2016.01.006
50. Tanriver Y, Diefenbach A. Transcription factors controlling development and function of innate lymphoid cells. *Int Immunol* (2014) 26:119–28. doi:10.1093/intimm/dxt063
51. Tindemans I, Serafini N, Di Santo JP, Hendriks RW. GATA-3 function in innate and adaptive immunity. *Immunity* (2014) 41:191–206. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.006
52. Diefenbach A. Innate lymphoid cells in the defense against infections. *Eur J Microbiol Immunol* (2013) 3:143–51. doi:10.1556/EuJMI.3.2013.3.1
53. Croxatto D, Micheletti A, Montaldo E, Orecchia P, Loiacono F, Canegallo F, et al. Group 3 innate lymphoid cells regulate neutrophil migration and function in human decidua. *Mucosal Immunol* (2016) 9(6):1372–83. doi:10.1038/mi.2016.10
54. DiMeglio P, Duarte JH, Ahlfors H, Owens ND, Li Y, Villanova F, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity* (2014) 40:989–1001. doi:10.1016/j.immuni.2014.04.019
55. De Obaldia ME, Bhandoola A. Transcriptional regulation of innate and adaptive lymphocyte lineages. *Annu Rev Immunol* (2015) 33:607–42. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112032
56. Kim BS, Wang K, Siracusa MC, Saenz SA, Brestoff JR, Monticelli LA, et al. Basophils promote innate lymphoid cell responses in inflamed skin. *J Immunol* (2014) 193:3717–25. doi:10.4049/jimmunol.1401307
57. Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* (1998) 9:9–23. doi:10.1016/S1359-6101(97)00022-1
58. Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* (1997) 389:978–81. doi:10.1038/40166
59. Zraggen S, Huggenberger R, Kerl K, Detmar M. An important role of the SDF-1/CXCR4 axis in chronic skin inflammation. *PLoS One* (2014) 9:e93665. doi:10.1371/journal.pone.0093665
60. Iikura M, Miyamasu M, Yamaguchi M, Kawasaki H, Matsushima K, Kitaoura M, et al. Chemokine receptors in human basophils: inducible expression of functional CXCR4. *J Leukoc Biol* (2001) 70:113–20.
61. De Klerck B, Geboes L, Hatse S, Kelchtermans H, Meyvis Y, Vermeire K, et al. Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12)

- in collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* (2005) 7:R1208–20. doi:10.1186/ar1806
62. Yang J, Hu S, Zhao L, Kaplan DH, Perdew GH, Xiong N. Selective programming of CCR10(+) innate lymphoid cells in skin-draining lymph nodes for cutaneous homeostatic regulation. *Nat Immunol* (2016) 17:48–56. doi:10.1038/ni.3312
63. Riis JL, Johansen C, Vestergaard C, Bech R, Kragballe K, Iversen L. Kinetics and differential expression of the skin-related chemokines CCL27 and CCL17 in psoriasis, atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *Exp Dermatol* (2011) 20:789–94. doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01323.x
64. Ma HL, Liang S, Li J, Napierata L, Brown T, Benoit S, et al. IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* (2008) 118:597–607. doi:10.1172/JCI33263
65. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farias M, Cardinale I, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* (2008) 159:1092–102. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08769.x
66. Harper EG, Guo C, Rizzo H, Lillis JV, Kurtz SE, Skorcheva I, et al. Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol* (2009) 129:2175–83. doi:10.1038/jid.2009.65

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Mora-Velandia, Castro-Escamilla, Méndez, Aguilar-Flores, Velázquez-Avila, Tussí-Luna, Téllez-Sosa, Maldonado-García, Jurado-Santacruz, Ferat-Osorio, Martínez-Barnette, Pelayo and Bonifaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.