



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

CONTRIBUCIÓN DE LINFOCITOS TH17 Y CÉLULAS LINFOIDES
INNATAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA PSORIASIS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR
DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
FACULTAD DE MEDICINA
DR. JESUS MARTÍNEZ BARNETCHE
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

CD. MX. FEBRERO DE 2019



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 bajo la tutoría de la Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso en el la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ), ubicado en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social.

Este proyecto se realizó con el financiamiento del fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (Proyectos R-2008-3601-62-FIS/IMSS/PROT/G11/939 y R-2017-785-058). Durante el desarrollo del proyecto de tesis – el sustentante- fue alumno del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de registro 267839.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Bonifaz Alfonzo por haberme permitido trabajar en su laboratorio a lo largo de este tiempo y por ser mi guía profesional desde la licenciatura. Gracias por enseñarme a ser crítico y honesto, además de ser un excelente ejemplo de como ser un investigador científico. Usted ha logrado sacar lo mejor de mi y es por ello que considero que es la mejor tutora para mi. Siempre estaré agradecido.

A la Dra. Rosana Pelayo Camacho por ayudarme en mi formación profesional durante este doctorado y por incentivar mi reflexión y el cuestionamiento científico. Al Dr. Jesús Martínez Barnetche por su apoyo como parte de mi comité tutor. Sus comentarios me retaron y generaron discusión científica. Muchas gracias por estar al pendiente y por su confianza después del termino de este proyecto.

A la Dra. Yvonne Rosenstein por la revisión profunda de esta tesis, por los consejos para la siguiente etapa y por su apoyo en tierras extranjeras. A la Dra. Paula Licona por sus comentarios al escrito y por los cuestionamientos científicos. Al Dr. Gustavo Pedraza y al Dr. Ignacio Terrazas por sus reflexiones y correcciones. Todos ustedes me permitieron mejorar sustancialmente este trabajo.

A la Dra. Alicia Lemini López por ser una médico comprometida con sus pacientes y por querer colaborar con nosotros. Usted es un ejemplo de que es posible hacer trabajos que conjunten la investigación clínica y básica en beneficio de las personas.

A la Dra. Luz María Mora Velandia por aceptar mi colaboración en su proyecto y enriquecer el mío. Muchas gracias por tu amistad incondicional, por tus consejos y tu apoyo en el trabajo. Fue un gusto enorme compartir el laboratorio.

A Gibrán Pérez Montesinos por enseñarme inmunología pero sobre todo por colaborar y enriquecer este proyecto durante estos años. Muchas gracias a ti y también a los colaboradores del centro dermatológico Ladislao de la Pascua por ayudarnos con el reclutamiento de pacientes.

A todos los pacientes que amablemente aceptaron participar en este proyecto de manera entusiasta y desinteresada. Espero que algún día este esfuerzo represente una mejora para ustedes.

A mis amigos del laboratorio Ara (mi sobrina favorita), Enrique, Ricardo, Panda (Andrés), Lorena, por compartir tantas horas de trabajo, por las aventuras en los congresos, por ser excelentes consejeros y amigos en los momentos difíciles.

Al los cDr. Luis Ángel Flores Mejía y Alberto García Lozano, por ser tan leales durante tanto tiempo. Siempre encontré sinceridad y amistad en ustedes. Gracias por tantos momentos compartidos desde la licenciatura hasta ahora, he aprendido mucho de ambos. Saben que se les estima profundamente.

A la M. en C. Cristina Aguilar Flores, gracias por confiar en mi para guiar uno de tus proyectos, aun con mi poca experiencia para dirigir. Por tu apoyo incondicional en todo momento, tu solidaridad, compromiso y contribución a este trabajo. Gracias por las risas y por ser tan amable, ha sido un placer trabajar a tu lado. Sabes que sin ti jamás habría logrado esto.

A la UNAM (en especial a la Preparatoria 9, Facultad de Química y a la Facultad de Medicina) por brindarme inigualables momentos lo largo de mi trayectoria en esta casa de estudios. Gracias por darme los conocimientos y vivencias que han enriquecido mi vida profesional y personal. Estoy orgulloso de haber pertenecido a esta institución y también de mi transformación como estudiante, como profesor y como investigador. Tengo la responsabilidad y el gusto de dejar tu nombre en alto, dondequiera que me encuentre.

A todos los contribuyentes mexicanos, los cuales permitieron que tuviera acceso a una beca y que pudiera realizar mis estudios de doctorado.

ÍNDICE

Índice.....	I
Índice de figuras y tablas.....	III
Abreviaturas.....	V
I. Resumen.....	1
Abstract.....	4
II. Introducción.....	7
III. Justificación.....	42
IV. Hipótesis.....	44
IV. Objetivos.....	44
V. Materiales y métodos.....	46
• <i>Reclutamiento y criterios de inclusión y exclusión de pacientes con psoriasis.....</i>	46
• <i>Muestras sangre venosa y biopsias de piel.....</i>	47
• <i>Anticuerpos utilizados para la identificación de linfocitos Th17 convencionales, patogénicos y de la población ILC CD123^{bajo}.....</i>	47
• <i>Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....</i>	48
• <i>Cultivo primario de piel y obtención de células dermales.....</i>	48
• <i>Aislamiento de células Th17 de sangre periférica.....</i>	48
• <i>Activación y proliferación de linfocitos Th17 aislados de sangre periférica.....</i>	49
• <i>Activación de células dermales.....</i>	49
• <i>Proliferación de linfocitos Th17.....</i>	49
• <i>Cuantificación de citocinas mediante arreglos de perlas citométricas.....</i>	50
• <i>Citometría de Flujo.....</i>	50
• <i>Inmunofluorescencia múltiple de biopsias de piel.....</i>	51
• <i>Análisis estadístico.....</i>	52
VI. Resultados.....	53
• <i>Identificación in situ de linfocitos Th17 (CD4⁺ RORγt⁺) en dermis</i>	

<i>lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis.....</i>	53
• <i>Identificación in situ de IL-17 en dermis lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis.....</i>	54
• <i>La estimulación con SEB induce el fenotipo patogénico en las células Th17 presentes en dermis de pacientes con psoriasis.....</i>	56
• <i>Presencia in situ de células Th17 patogénicas.....</i>	59
• <i>La estimulación con SEB induce características funcionales patogénicas en células Th17 presentes en la dermis lesionada.....</i>	61
• <i>SEB induce un microambiente patogénico en dermis lesionada de pacientes con psoriasis.....</i>	63
• <i>La adquisición del fenotipo patogénico en respuesta al SEB ocurre en células Th17 de dermis lesionada y sangre periférica.....</i>	66
• <i>La estimulación vía TCR induce las características patogénicas en linfocitos Th17 aislados de sangre periférica.....</i>	68
• <i>Identificación de células CD123^{bajo} con características de linfocitos innatos en dermis de pacientes con psoriasis.....</i>	70
• <i>La población ILC CD123^{bajo} presentes en dermis lesionada produce IL-17 e IL-22 de manera basal y después de activación.....</i>	71
VII. <i>Discusión.....</i>	76
VIII. <i>Conclusiones.....</i>	91
IX. <i>Perspectivas.....</i>	93
X. <i>Bibliografía.....</i>	95
XI. <i>Anexos.....</i>	110

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		Página
Figura 1	Histología de la piel sana y psoriásica	8
Figura 2	Fisiopatología de la Psoriasis	10
Figura 3	Receptor de la IL-17 y su señalización	13
Figura 4	Plasticidad de linfocitos T cooperadores	25
Figura 5	Generación de linfocitos Th17 convencionales y patogénicos	30
Figura 6	Desarrollo y poblaciones de ILC	33
Figura 7	Identificación <i>in situ</i> de linfocitos Th17 (CD4 ⁺ ROR γ t ⁺) en dermis lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis	53
Figura 8	Identificación <i>in situ</i> de IL-17 en dermis lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis	54
Figura 9	Porcentaje de células <i>in situ</i> CD4 ⁺ ROR γ t ⁺ y CD4 ⁺ IL-17 ⁺ en dermis lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis.	55
Figura 10	Los linfocitos Th17 se encuentran en dermis lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis	56
Figura 11	La estimulación con SEB incrementa la expresión de ROR γ t, T-bet y Runx1 en linfocitos Th17 de dermis NLS y LS	57
Figura 12	La estimulación con SEB induce el incremento de linfocitos Th17 con fenotipo patogénico	59
Figura 13	Presencia <i>in situ</i> de linfocitos Th17 con fenotipo funcional patogénico	60
Figura 14	La estimulación con SEB induce un fenotipo funcional patogénico en linfocitos Th17 de dermis lesionada	62
Figura 15	La estimulación con SEB no induce un fenotipo funcional patogénico en linfocitos Th17 de dermis sin lesión, dermis sana y en dermatitis atópica	63
Figura 16	Inducción de un microambiente patogénico en dermis lesionada después de la estimulación con la Enterotoxina B de <i>S. aureus</i>	64
Figura 17	La presencia de IL-9 después de la activación con SEB correlaciona negativamente con la severidad de la psoriasis	65
Figura 18	La estimulación con SEB induce el fenotipo patogénico en linfocitos Th17 de dermis lesionada y sangre periférica	66
Figura 19	Los linfocitos Th17 de la dermis lesionada adquieren una mayor plasticidad funcional	68
Figura 20	La activación a través de CD3/CD28 induce plasticidad fenotípica y funcional en linfocitos Th17 aislados de sangre periférica	69
Figura 21	La población con características de ILC CD123 ^{bajo}	71

	esta incrementada en dermis lesionada de pacientes con psoriasis	
Figura 22	La población ILC CD123 ^{bajo} produce IL-17 e IL-22 aun sin estimulación en dermis sin lesión y lesionada de pacientes con psoriasis	72
Figura 23	La población ILC CD123 ^{bajo} incrementa la producción de IL-17 e IL-22 en dermis lesionada de pacientes con psoriasis	73
Figura 24	La población ILC CD123 ^{bajo} tiende a incrementar la producción de IL-17 en dermis no lesionada de pacientes con psoriasis	74
Figura 25	Los linfocitos Th17 patogénicos y la población ILC CD123 ^{bajo} como contribuyentes en la fisiopatología de la psoriasis	89

ABREVIATURAS

ADAMTSL5: Proteína 5 desintegrina y metaloproteínasa con motivos tipo de trombospondina.

AhR: Receptor de Aril Hidrocarburos.

CFSE: Carboxifluoresceína Succinimidil Éster.

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica.

CPA: Célula Presentadora de Antígeno.

CTV: Cell Trace Violet.

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño.

EAE: Encefalitis Autoinmune Experimental.

FoxP3: Caja con cabeza de horquilla p3.

GATA3: Proteína 3 de unión a GATA.

IL: Interleucina.

ILC: Célula Linfoide Innata.

IFN- γ : Interferón gamma.

JAK: Cinasa Asociada Janus.

LL-37: Catelicidina.

LS: Lesionada.

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NLS: No Lesionada.

PASI: Índice de Área y Severidad en Psoriasis.

PMA: Forbol-12-Miristato-13-Acetato.

PS: Piel sana.

PSORS: Loci de susceptibilidad a Psoriasis.

Q17: Queratina 17.

ROR γ t: Receptor Huérfano gama t relacionado al Receptor de Ácido Retinoico.

Runx1: Factor de Transcripción 1 relacionado a RUNT.

SEB: Enterotoxina-B de *Staphylococcus aureus*.

T-bet: T-box Expresado en Células T.

TCR: Receptor de Células T.

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante beta.

Th: Linfocito T Cooperador.

Th17: Linfocito T Cooperador 17.

TLR: Receptor Tipo Toll.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

STAT: Transductor de la Señal y Activador de la Transcripción.

I. RESUMEN

RESUMEN

La psoriasis es una enfermedad dermatológica con inflamación crónica caracterizada por la presencia de lesiones en forma de placa debida a una excesiva proliferación de queratinocitos. Estas lesiones contienen un gran infiltrado de células inmunes como neutrófilos, células dendríticas, células linfoides innatas y linfocitos T entre otras, las cuales se han propuesto como participes en la fisiopatología de la enfermedad.

Este proceso inflamatorio es mantenido por citocinas producidas por las células inmunes innatas y adaptativas, donde se ha observado que la interleucina 17 tiene un papel crucial en este proceso, ya que es capaz de activar a los queratinocitos así como a los neutrófilos. La IL-17 es una citocina producida principalmente por los linfocitos T, específicamente los linfocitos cooperadores 17 (Th17). De acuerdo con esto, en los pacientes con psoriasis los linfocitos Th17 producen dicha citocina. En condiciones inflamatorias crónicas, se ha propuesto que las células Th17 pueden tener dos fenotipos diferentes denominados como “convencional” y “patogénico”. Las Th17 convencionales expresan el factor de transcripción ROR γ t y producen IL-17, mientras que las patogénicas expresan ROR γ t, T-bet y pueden producir simultáneamente IL-17/IFN- γ o solo IFN- γ . Además, se ha observado en modelos de ratón como la encefalitis autoinmune experimental que las células Th17 con fenotipo patogénico inducen una mayor severidad de la enfermedad. En humanos, la severidad de la psoriasis puede estar asociada a la presencia de microorganismos como *S. aureus* y de su superantígeno la enterotoxina B (SEB). Sin embargo, en psoriasis se desconoce cuál es el fenotipo de las células Th17 y si una molécula asociada con la severidad pudiera impactar el fenotipo y función de estas células.

Además de los linfocitos Th17, existen otras células linfoides capaces de producir la IL-17 denominadas como células linfoides innatas (ILC). Estas ILC se caracterizan por carecer de marcadores de linaje, poseer morfología linfoide y compartir características fenotípicas y funcionales con los linfocitos T cooperadores y citotóxicos. Además de participar en la inmunidad contra virus y bacterias, las ILC se han encontrado incrementadas en diversas condiciones inflamatorias como colitis y

en la enfermedad de Crohn, sugiriendo que tienen un papel en la fisiopatología de estas enfermedades. En el caso particular de la psoriasis, las ILC están incrementadas en las lesiones pero no son capaces de producir IL-17. Un trabajo previo realizado en nuestro grupo de trabajo reveló una población con características de ILC que expresa el marcador CD123 (ILC CD123^{bajo}), con tropismo a piel y de manera interesante expresa el factor de transcripción ROR γ t y puede producir IL-17. Sin embargo desconocemos si esta población de ILC existe en la dermis de los pacientes y si sus características funcionales podrían contribuir a la psoriasis.

En este trabajo nos enfocamos en determinar si un estímulo asociado con la severidad de la psoriasis como el SEB pudiera modificar el fenotipo y función de los linfocitos Th17 y su posible implicación en la severidad de la psoriasis. Además, determinamos si la población innata ILC CD123^{bajo} está presente en la dermis de pacientes con psoriasis y si pudiera contribuir en la fisiopatología a través de la producción de IL-17. Nuestros resultados muestran que las células Th17 están incrementadas en la dermis lesionada y *ex vivo* se observa células con fenotipo convencional y patogénico. De manera interesante la estimulación con SEB indujo el incremento en células Th17 patogénicas así como la disminución en la producción de IL-17 y el incremento en la producción de IFN- γ , revelando la adquisición de características funcionales patogénicas. Al analizar la población ILC CD123^{bajo} encontramos un incremento en la dermis lesionada de estos pacientes en comparación con dermis no lesionada. Funcionalmente, la población ILC CD123^{bajo} es capaz de producir IL-17 e IL-22 de manera basal y después de una estimulación, siendo esta producción mayor en la dermis lesionada. En conjunto estos resultados revelan un posible mecanismo que promueve la plasticidad y altera la función de los linfocitos Th17 en los pacientes con psoriasis así como una nueva población de ILC que pudiera contribuir en la fisiopatología de la enfermedad.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease characterized by plaque lesion due to excessive keratinocyte proliferation. These lesions contain immune cell infiltration such as neutrophils, dendritic cells, innate lymphoid cells and T lymphocytes, which have been proposed players in the physiopathology of the disease.

The inflammatory process is maintained by innate and adaptive cytokines where IL-17 plays an important role, able to activate keratinocytes and neutrophils. For many years, IL-17 was considered a cytokine exclusive for T lymphocytes, specifically Th17 lymphocytes. In psoriasis patients, Th17 lymphocytes are important IL-17 producers. Recently, in chronic inflammatory diseases, it has been suggested that Th17 lymphocytes show two different phenotypes named conventional and pathogenic. Conventional Th17 lymphocytes express ROR γ t and produce IL-17, whereas pathogenic Th17 lymphocytes express ROR γ t, T-bet, produce IL-17/IFN- γ at the same time or only maintain IFN- γ production. In mice models such as experimental autoimmune encephalitis, the pathogenic Th17 lymphocytes induce an increased disease severity. In humans, psoriasis severity has been associated to the presence of a bacterial microorganism such as *S. aureus* or its bacterial superantigens such as enterotoxin-B (SEB). However, in psoriasis remains unknown which is the Th17 lymphocyte and if a molecule associated with disease severity could impact the phenotype and function of these cells.

In addition of Th17 lymphocytes, there are other lymphoid cells capable to produce IL-17 named innate lymphoid cells (ILC). The ILC is characterized by lacking lineage markers, lymphoid morphology and share phenotypic and functional features with the helper and cytotoxic T lymphocytes. In addition to participate in immunity against bacterial and virus, ILC has been found increased in several inflammatory conditions such as colitis and Crohn's disease, suggesting that they have a possible role in the physiopathology. In psoriasis, it has been observed an increased frequency of ILC has been observed in lesional skin however these cells are not able to produce IL-17. In a previous work done in our laboratory, we described a population with ILC

features that express CD123 (ILC CD123^{low}), with skin homing and interestingly with the capacity to express ROR γ t and IL-17. However, we still do not know if this population are present in the lesional skin and if their functional properties could contribute in psoriasis.

In this work, we focused to determine if a psoriasis severity associated stimuli such as SEB could modify the phenotype and function of Th17 lymphocytes, and its possible role in disease severity. In addition, we determine if the ILC CD123^{low} population is present in psoriatic skin and if could contribute to the physiopathology through IL-17 production. Our results show that Th17 lymphocytes are increased in lesional skin, which has conventional and pathogenic Th17 lymphocytes *ex vivo*. Remarkably, SEB stimulation induces the increased frequency of pathogenic Th17 lymphocytes, a decreased in IL-17 production and increased IFN- γ production, unveiling the acquisition of functional pathogenic features. The ILC CD123^{low} population is increased in lesional skin compared to non-lesional skin. Functionally, the ILC CD123^{low} population is able to produce IL-17 and IL-22 before and after stimulation, which is increased in lesional skin. Altogether these results reveal a possible mechanism that promotes the plasticity and modifies the Th17 function in psoriasis patients as well as a novel ILC population that could contribute to the physiopathology of the disease.

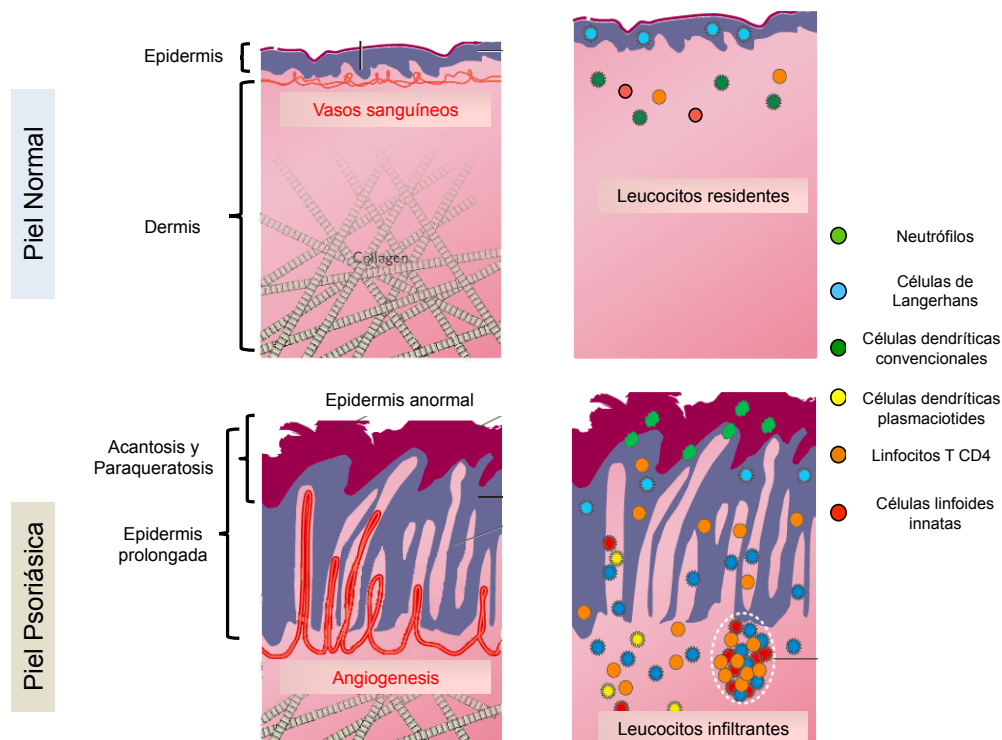
II. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Características y epidemiología de la psoriasis

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria cutánea caracterizada por lesiones en forma de placa, las cuales tienen un área bien delimitada y son debidas a la excesiva proliferación y diferenciación inadecuada de los queratinocitos¹. Su prevalencia en el mundo se estima que está entre el 2 al 3% de la población mientras que en México este porcentaje es aproximadamente del 0.5%². Las lesiones psoriásicas pueden presentarse en todo el cuerpo, aunque hay predilección por ciertos sitios anatómicos como codos, rodillas y piel cabelluda. Existen diversas formas clínicas siendo, la mas común la psoriasis vulgar, que se presenta del 80 al 90% de los casos³. Las características clínicas de estas lesiones incluyen la presencia de eritema generado por la dilatación y formación de vasos sanguíneos, descamación originada por la excesiva proliferación de los queratinocitos e induración debida al gran infiltrado de células inmunes⁴. Estas características junto con el área afectada son necesarias para determinar la severidad de la enfermedad. Esta se calcula a través del índice de severidad y área en psoriasis (PASI, Psoriasis Area Severity Index, por sus siglas en ingles) el cual tiene un valor de 0 a 72, donde 72 se considera como la forma mas severa⁵.

El diagnóstico de la psoriasis se realiza con base en las observaciones clínicas de las lesiones (forma delimitada, eritema, induración, descamación) y, en escasas ocasiones, se requiere la toma de una biopsia para confirmar el diagnóstico⁴. Entre los cambios histológicos observados en la piel de estos pacientes se encuentran la acantosis (engrosamiento de la epidermis), paraqueratosis (presencia de núcleo en células del estrato corneo) así como prolongaciones de la epidermis hacia la dermis. Además se observa un infiltrado de neutrófilos, células cebadas y macrófagos en la epidermis denominados microabscesos de Munro, mientras que en la dermis se encuentra un gran infiltrado de células T, linfocitos innatos y células dendríticas² (Figura 1).



Modificado de Lowes Et. al. Nature (2007)

Figura 1. Histología de la piel sana y psoriásica. La piel está conformada la dermis y la epidermis. Algunos de los cambios histológicas de la lesión psoriásica con respecto a la piel sana comprenden el engrosamiento de la epidermis (acantosis) y la retención del núcleo en los queratinocitos (Paraqueratosis). En la dermis lesionada se observa un mayor infiltrado de células inmunes y la generación de vasos sanguíneos (angiogénesis).

Fisiopatología de la psoriasis

La psoriasis fue descrita en 1808 por Robert Willan y se consideró durante mucho tiempo como una enfermedad infecciosa causada por hongos. Ahora se sabe que es una enfermedad crónica cutánea cuya etiología aun permanece desconocida. Sin embargo, se ha demostrado que factores ambientales, genéticos e inmunológicos pueden ser factores desencadenantes o perpetuadores de la enfermedad.

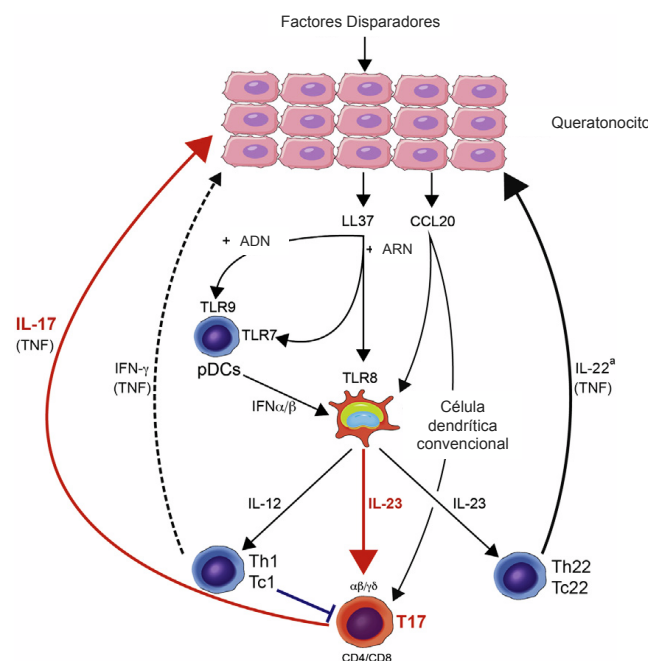
Se ha propuesto que traumatismos en la piel, los cuales liberan DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns, por sus siglas en ingles) pueden ser un factor ambiental desencadenante de la psoriasis. Otros factores ambientales como las infecciones en garganta por estreptococos β -hemolíticos han sido asociadas con la aparición de la psoriasis⁶. Aunado a esto, el análisis de la microbiota presente en las

lesiones muestra un aumento de firmicutes entre los cuales *Staphylococcus aureus* es una de las especies incrementadas con respecto a la microbiota presente en sujetos sanos^{7,8}. También se ha observado que la enterotoxina-B (SEB), la cual es un superantígeno de *S. aureus* se encuentra incrementada en las lesiones⁹. Un estudio reveló que la aplicación de parches con SEB en la lesión puede inducir un infiltrado de células mononucleares así como un incremento del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)¹⁰. De manera interesante se encontró que pacientes con PASI alto tienen una mayor presencia del SEB y viceversa, demostrando que existe una correlación entre el SEB y la severidad de la enfermedad^{9,11,12}.

Los factores genéticos relacionados con la psoriasis están presentes en diferentes loci los cuales han sido denominados como loci de susceptibilidad a psoriasis (PSORS, Psoriasis Susceptibility Loci, por sus siglas en ingles), comprenden del PSORS1 a PSORS9 y contienen moléculas que participan en la respuesta inmune innata y adaptativa. Por ejemplo, la molécula CARD14 (Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 14, por sus siglas en ingles) participa en la inmunidad innata mediante el ensamble del inflamasoma y activando al factor de transcripción NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Se ha observado que mutaciones en esta molécula incrementan la actividad de este factor de transcripción, favoreciendo la expresión de diversas moléculas inflamatorias. Además, mutaciones en NFKBIA el cual codifica la proteína inhibidora I κ B α de NF- κ B se ha asociado con la psoriasis⁴.

Con respecto a los factores genéticos relacionados a la inmunidad adaptativa se ha demostrado que PSORS1 contiene el alelo de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase I HLA-Cw06*02, la cual se ha asociado a la psoriasis en diversas poblaciones y hasta en un 70% en gemelos homocigotos¹. Otro ejemplo es el polimorfismo observado en el receptor de IL-23 en el cual hay cambio de una adenina por guanina, lo que confiere una menor susceptibilidad a desarrollar psoriasis¹³. Estas y otras mutaciones han sido asociadas con el mantenimiento del ambiente inflamatorio en los pacientes con psoriasis.

El otro gran componente que participa en la psoriasis es el inmunológico debido a un gran infiltrado de células inmunes en las lesiones de los pacientes. En la fisiopatología de la psoriasis, se propone que los queratinocitos y las células dendríticas plasmacitoides (pDC) presentes en las lesiones reconocen a través de TLR9 un complejo molecular formado por el péptido antimicrobiano catelicidina (LL-37) y ADN o ARN. Este reconocimiento genera la activación de las células pDC y la producción de IFN- α , el cual activa a las células dendríticas dermales y genera la activación de linfocitos T^{14,15}. Además, estas células dendríticas dermales son capaces de producir IL-23, la cual favorece la polarización de los linfocitos T hacia un fenotipo Th17. Ya en las lesiones, los linfocitos Th17 producen citocinas como IL-17 e IL-22 que inducen la activación y proliferación de los queratinocitos. Finalmente estos queratinocitos producen citocinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α y quimiocinas como CCL20 y CXCL8, las cuales favorecen el reclutamiento de más células a la lesión, perpetuando así el ambiente inflamatorio^{16,17} (Figura 2).



Jaehwan K. Et. al. Dermatologic Clinics (2015)

Figura 2. Fisiopatología de la psoriasis. El modelo propuesto para el desarrollo de la psoriasis contempla la presencia de los factores disparadores (Infecciones y traumatismos), la subsecuente activación de células dendríticas plasmacitoides y convencionales así como la activación y diferenciación de los linfocitos T hacia el perfil Th1 y Th17. Estas células efectoras producen citocinas como IL-17, IL-22 e IFN- γ las cuales favorecen la proliferación, activación de los queratinocitos y el mantenimiento del ambiente inflamatorio.

Tratamiento de la psoriasis

Los tratamientos que se utilizan para esta enfermedad son de diferente tipo y dependerán de la respuesta del paciente. El primer tratamiento de elección incluye el uso de medicamentos tópicos como emolientes, derivados de la vitamina D, del alquitrán de hulla y glucocorticoesteroides. Estos tienen un efecto hidratante, antiproliferativo en los queratinocitos e inmunosupresor, ayudando a controlar la generación de lesiones. Si no hay respuesta a este tratamiento, entonces se utilizan inmunosupresores orales como el metotrexato o la ciclosporina A, solos o en combinación con fototerapia ultravioleta A o B⁷.

El tratamiento con anticuerpos es la última línea de tratamiento, la cual ha sido desarrollada en la última década. Medicamentos como el Etanercept (proteína de fusión), Infliximab o Adalimumab los cuales neutralizan al TNF- α han mostrado buenos resultados ya que disminuyen el ambiente inflamatorio aunque también tienen efectos adversos como son las constantes infecciones bacterianas^{18,19}. Otro anticuerpo utilizado es el Ustekinumab, el cual une a la subunidad p40 que comparten la IL-12 e IL-23, evitando la polarización de los linfocitos T hacia un perfil Th1 y Th17 respectivamente²⁰. El anticuerpo más reciente es el Secukinumab, el cual bloquea la IL-17A favoreciendo la disminución del ambiente inflamatorio en las lesiones. Se ha observado que este tratamiento induce una mejora hasta en el 90% de los pacientes con psoriasis, mostrando que esta citocina es uno de los mediadores importantes en la fisiopatología de la psoriasis²¹.

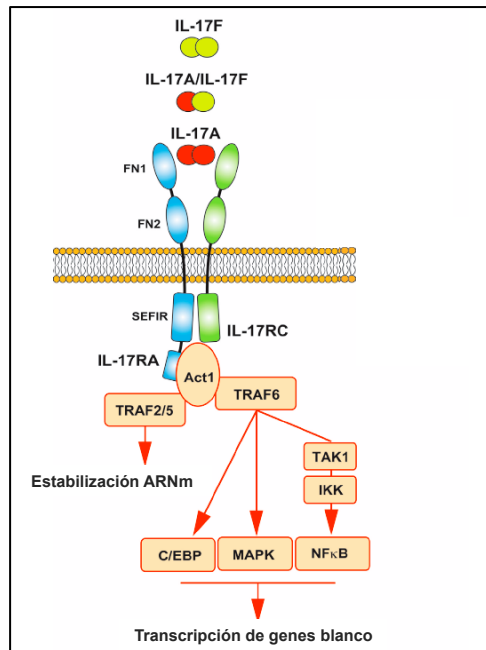
Las características y funciones de la Interleucina 17

La Interleucina 17 fue descubierta en un cultivo de células T y se observó que tenía la capacidad de incrementar la expresión de IL-6, IL-8 e ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) en fibroblastos humanos²². La IL-17 pertenece a una familia que consta de cinco miembros que comprenden desde IL-17A hasta la IL-17F, los cuales interactúan con los cinco receptores descritos (IL-17RA, B, C, D y E)²³. La IL-17A y la IL-17F son citocinas inflamatorias; pueden estar en forma de homodímero o heterodímero, siendo esta última la forma más común en células mononucleares de

sangre periférica²⁴. La expresión de IL-17 es inducida principalmente por las citocinas IL-6 y TGF- β (Transforming Growth Factor beta, por sus siglas en inglés), aunque otras citocinas como IL-1 β , IL-23 e IL-21 también son capaces de inducir su expresión²⁵. Además, los factores de transcripción como ROR γ t (Retinoic Acid Receptor-related orphan receptor gamma t) ROR γ t, ROR α (Retinoic Acid Receptor-related orphan receptor alpha t,) y Runx1 (RUNT-related transcription factor) se pueden unir de manera directa al gene de *il-17a* y promover su expresión²⁶.

Las citocinas de la familia de la IL-17 pueden interactuar con IL-17RA, el cual está expresado en células hematopoyéticas o con IL-17RC cuya expresión es elevada en células no hematopoyéticas^{27,28}. Estas interacciones inducen una cascada de señalización que generan la activación del factor de transcripción NF- κ B, en particular de las sub-unidades p50 y p65. El IL-17R señala a través los dominios SEFIR (SEF/IL17R domain), TILL (Tir-like loop) y la proteína ACT1, los cuales son análogos funcionales de los dominios TIR (Toll/IL1R domain), MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) y TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β) en la vía de señalización de IL-1 y TLR. La unión de IL-17 con su receptor activa la vía de las MAP cinasas, AP1 (Activator Protein 1) y el incremento de C/EBP β (CCAAT-enhancer-binding protein beta) y C/EBP δ (CCAAT-enhancer-binding protein delta) en ciertos promotores de sus genes blanco^{29,30} (Figura 3).

Las moléculas que se expresan en respuesta a la IL-17 son péptidos antimicrobianos como β -defensinas, catelicidinas, RegIII (Regenerating islet-derived protein 3) y lipocalina 2. También induce citocinas como IL-6, G-CSF, GM-CSF, quimiocinas como CCL2, CCL7, CCL20 CXCL1, CXCL2 así como las metaloproteinasas de matriz MMP3 y MMP13^{31,32,33}. En el caso de la psoriasis, la IL-17 actúa sobre los queratinocitos favoreciendo la expresión de catelicidina (LL-37), IL-6, CCL20, habiendo un efecto sinérgico en presencia de TNF- α . Además, la IL-17 genera el reclutamiento, activación y sobrevivencia de neutrófilos mediante la inducción de IL-8³⁴. En resumen la psoriasis es una enfermedad donde las células inmunes y en específico la IL-17 tienen un papel muy importante en la fisiopatología.



Constantino-Bremilla. Et. al. Front Immunol (2018)

Figura 3. Receptor de interleucina 17 y su señalización. El receptor de IL-17A o IL-17F está constituido por el heterodímero IL-17RA y RC. Una vez unida la citocina, se induce una señalización mediada por el dominio SEFIR lo que genera la activación de TRAF 2/5 y de TRAF6 lo que conlleva a la activación de C/EBP, la vía de las Map cinasas y de NF-κB para la expresión de sus genes blanco.

Linfocitos T en psoriasis

Como ya se mencionó anteriormente, la psoriasis es una enfermedad con múltiples factores desencadenantes entre ellos el inmunológico. Uno de los primeros trabajos que sugirió la participación de los linfocitos T en la psoriasis fue derivado del estudio de las biopsias de estos pacientes. En ellas se encontró un gran infiltrado de leucocitos, preferentemente de linfocitos T CD4, CD8 y células dendríticas³⁵. Además, estos linfocitos infiltrantes eran capaces de proliferar³⁶ y adquirir un fenotipo Th1 al co-cultivarse con células dendríticas aisladas de la piel lesionada³⁷. Otros estudios demostraron que el uso de inmunosupresores como la ciclosporina A, la cual afecta la actividad de los linfocitos T, generaba una mejora en los pacientes³⁸. Por otra parte, en pacientes con leucemia y que además presentaban psoriasis, la enfermedad cutánea mejoraba posterior al trasplante de médula ósea³⁹.

Estas evidencias sugieren que el sistema inmune y en específico los linfocitos T podrían participar en la enfermedad.

Uno de los factores disparadores de la psoriasis son las infecciones por estreptococos β -hemolíticos, principalmente infecciones por *Streptococcus pyogenes*, ya que se ha reportado la generación de lesiones después de infecciones en garganta. Esto pudiera ser debido a que la proteína M de *S. pyogenes* tiene epítopes compartidos con algunas queratinas expresadas en la piel, generando así un mimetismo molecular. Esto se demostró estimulando linfocitos T aislados de pacientes con cuatro secuencias de aminoácidos compartidos entre las queratinas 14, 16, 17 y la proteína M, dando como resultado la producción de IFN- γ ⁴⁰. También se observó que la queratina 17, la cual es reconocida por linfocitos T CD8, está sobre-expresada en las lesiones de los pacientes, sugiriendo que las células T tienen el potencial de reconocer componentes de la piel y activarse⁴⁰.

Haciendo uso del ratón AGR129, el cual permite el trasplante de piel humana ya que carece de los interferones tipo I y II así como una mutación en el gen activador de la recombinación 2 (RAG2), se realizó un trasplante de dermis no lesionada de paciente con psoriasis. Se observó un incremento en la proliferación de los queratinocitos, en el infiltrado de linfocitos T y de citocinas como IFN- γ , IL-12 y TNF- α , además de manifestarse acantosis y papilomatosis. Finalmente, al eliminar a los linfocitos T con un anticuerpo anti-CD3, los ratones trasplantados no desarrollaron lesiones. Por lo tanto, se demostró que los linfocitos T son necesarios para la generación de las lesiones psoriásicas⁴¹. Sin embargo aun no se conocía el mecanismo por el cual contribuían a formar las lesiones.

Trabajos recientes han aportado evidencia de otros posibles autoantígenos en psoriasis, como el caso del péptido antimicrobiano LL-37. Este péptido es capaz de inducir la proliferación y producción de IL-17 e IL-22 en linfocitos T CD8⁺ circulantes, dependiente de la molécula HLA-Cw6⁴². Además, algunas secuencias de LL-37 pueden unirse a moléculas de histocompatibilidad clase II como HLA-DR1, HLA-DR4 y HLA-DR11, confiriéndole el potencial de ser reconocido por los LT CD4⁺⁴². Otro de los posibles autoantígenos es ADAMTSL5 (A desintegrin and

Metalloproteinase with Thrombospondin motifs like-protein 5), la cual se encuentra expresada en los melanocitos, es reconocida por el TCR de algunos linfocitos T CD8 e induce la expresión de IL-17 e IL-22 en pacientes con psoriasis⁴³. Estos trabajos sugieren fuertemente que los linfocitos T están implicados en el proceso inflamatorio de la psoriasis.

Además del incremento en el ambiente inflamatorio, se ha reportado que los pacientes con psoriasis tienen una deficiencia en los mecanismos que regulan el sistema inmune. Por ejemplo, las células T reguladoras FoxP3⁺ (Forkhead box P3) presentes en la dermis lesionada no son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T efectores⁴⁴. Adicionalmente, existe otra población de células T reguladoras denominadas como Tr1, la cual se caracteriza por producir IL-10, por carecer de FoxP3 y expresar CD49b y LAG3 (Lymphocyte-Activation Gene 3)⁴⁵. Recientemente se observó que la frecuencia de las células Tr1 correlaciona negativamente con el PASI de los pacientes con psoriasis. Además esta población se encuentra prácticamente ausente en la dermis lesionada en comparación con la dermis sin lesión o dermis sana donde se aprecian células Tr1⁴⁶. En conjunto, estos trabajos muestran que en psoriasis, los linfocitos T promueven un ambiente inflamatorio al reconocer autoantígenos y que los mecanismos reguladores son ineficientes, lo que permite el mantenimiento de las lesiones.

Las características, funciones y fenotipos de los linfocitos Th17

Los linfocitos Th17 son una de las poblaciones de células T cooperadoras presentes en intestino y otros órganos periféricos y se caracterizan por la producción de IL-17, IL-22 e IL-21 así como por la expresión del factor de transcripción ROR γ t²⁶. El descubrimiento de los linfocitos Th17 proviene de los estudios realizados en el modelo de ratón de encefalitis autoinmune experimental (EAE), donde la presencia de IFN- γ es una de las características de esta enfermedad. En este modelo, se observó que la deficiencia de IL-23 genera una disminución en el infiltrado celular y en la cantidad de IL-17 pero aumenta la resistencia a desarrollar la enfermedad⁴⁷. Esto permitió proponer la existencia de células Th adicionales a las Th1 y Th2, las cuales fueron denominadas como “Th17”. Esta población se caracterizó por la gran

producción de IL-17, además de que no dependían de los factores de transcripción T-bet, STAT1 y STAT4 para su generación y de ser inhibidas por IFN- γ e IL-4⁴⁸.

Aunque los linfocitos Th17 no son los únicos capaces de producir IL-17, su importancia en la protección contra de infecciones por *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* ha sido ampliamente demostrada⁴⁹. Sin embargo, estas células también han sido asociadas a diversas enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes que se creían eran mediadas por linfocitos Th1 principalmente.

Diferenciación de los linfocitos Th17

Al igual que los linfocitos Th1 y Th2, los linfocitos Th17 requieren de citocinas polarizantes durante la presentación de antígeno. Sin embargo, a diferencia de los otros dos tipos de Th, las células Th17 requieren de la presencia de dos o más citocinas para su diferenciación, entre las cuales se encuentran la IL-6 y el TGF- β así como la IL-21 e IL-23²⁶. Además, esta polarización es controlada por la expresión de factores de transcripción maestros como ROR γ t y STAT3 aunque, ahora se conoce la existencia de combinaciones de citocinas y algunos otros factores de transcripción que pueden regular la diferenciación de los linfocitos Th17^{25,26}.

IL-6: la interleucina 6 es una citocina pro-inflamatoria expresada en células inmunes innatas como monocitos, macrófagos y células dendríticas así como por los hepatocitos. Esta interleucina se produce en respuesta a ligandos de TLR y a las citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-17²⁶. La IL-6 induce la diferenciación de macrófagos, maduración de células B, supervivencia de las células plasmáticas y la diferenciación de las células Th17. Esta última función se propuso ya que los ratones carentes de IL-6 tenían una menor frecuencia de linfocitos Th17⁵⁰. La IL-6 es reconocida a través de su receptor IL-6R formado por el dímero IL-6R α y gp130 (la cual está expresada de manera ubicua) que se encarga de la señalización, a través de las cinasas JAK1/2. Esto resulta en la activación del factor de transcripción STAT3 y se promueve la expresión de IL-21 e IL-23, favoreciendo la diferenciación de Th17^{51,52}.

TGF- β : El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es secretado por diversas células incluidas las células T reguladoras y puede interactuar con el receptor TGF- β RI o II, generando una señalización a través de las moléculas SMAD (Mothers Against Decapentaplegic homolog). Su función en la diferenciación de las células Th17 ha sido controversial ya que esta citocina participa en la polarización de linfocitos T hacia el perfil T regulador a través del complejo SMAD2/3-SMAD4⁵³. Sin embargo, las evidencias han mostrado que ratones carentes de esta citocina tienen muy pocos linfocitos T IL-17⁺ así como protección en el modelo de EAE^{54,55}.

Se ha propuesto que TGF- β podría estar participando en la diferenciación de linfocitos Th17 a través de dos mecanismos. El primer mecanismo involucra la señalización de TGF- β mediante la vía de JNK/c-Jun, inhibiendo al factor de transcripción Eomes (Eomesodermin), el cual es un regulador negativo de la expresión de *Rorc* y de *il17a*⁵⁶. El segundo mecanismo requiere de la formación del complejo SMAD2/3 junto con Trim33 (molécula que participa en la vía no canónica de señalización de TGF- β), promoviendo la degradación de SMAD4. Esto reprime la expresión de IL-10 y junto con ROR γ t promueve la expresión de IL-17⁵⁷.

IL-21: Esta citocina pertenece a la familia de la IL-2 y es producida principalmente por linfocitos T CD4⁺ activados, promoviendo la proliferación de células T, B y la generación de células NK altamente líticas a través de su interacción con IL-21R⁵⁸. La IL-21 es producida por las células Th17 y su presencia en conjunto con TGF- β o con IL-6 promueve la expresión de ROR γ t y de IL-17. También se ha reportado que la IL-21 puede favorecer la generación de células Th17 en un contexto carente de IL-6, lo que podría representar una vía alterna de diferenciación⁵⁹ aunque, la ausencia de esta citocina no impacta de manera significativa la diferenciación de células Th17⁶⁰. Con toda esta evidencia aun permanece controversial su importancia en la diferenciación de células Th17 pero su actividad autocrina capaz de inducir proliferación de estas células ha sido demostrada⁶¹.

IL-23: Esta citocina forma parte de la familia de la IL-12, compartiendo la subunidad IL-12p40 con la IL-12, pero la IL-23 forma un dímero con la subunidad IL-23p19. La

interleucina 23 es producida principalmente por células dendríticas y macrófagos mientras que su receptor (IL-23R) está presente en células epiteliales, NK, NKT, células dendríticas así como en linfocitos T de memoria y células Th17⁶². La interacción con su receptor genera la activación de JAK2 y posteriormente la activación de STAT3 favoreciendo el perfil Th17.

La IL-23 fue la primera citocina asociada a la producción de IL-17⁴⁷ y se propone que su función está más relacionada con el mantenimiento que con la diferenciación de los linfocitos Th17 ya que las células naive no expresan IL-23R. Su función en las células Th17 parece ser de retroalimentación positiva, ya que IL-23 induce la activación de STAT3, el cual promueve la expresión de *il23r* y *Rorc*. Una vez expresado, ROR γ t controla la expresión de las moléculas del perfil Th17 y mantiene la expresión de IL-23R, favoreciendo esta retroalimentación⁶³. Además, se ha observado que la IL-23 promueve el mantenimiento y la proliferación *in vitro* de las células Th17 y disminuye la presencia de células T FoxP3⁺ en un modelo de colitis inducida⁶⁴, lo cual podría favorecer aún más la presencia de células Th17.

ROR γ t: Este factor de transcripción pertenece a la familia de receptores nucleares relacionados al ácido retinoico y considerados como huérfanos porque no se habían identificado sus ligandos. La familia ROR está compuesta por los miembros ROR α , ROR β y ROR γ , los cuales participan en el desarrollo y la diferenciación celular. De manera interesante la isoforma t de ROR γ está expresada solamente en células inmunes, participando en el desarrollo de linfocitos T, formación de tejido linfoide y diferenciación hacia el perfil Th17⁶⁵.

ROR γ t fue el primer factor de transcripción descrito como esencial en la diferenciación de las células Th17, ya que ratones carentes de este factor tenían números reducidos de linfocitos T CD4⁺ IL-17⁺ *in vitro* o en la lamina propia. Además, se demostró que ROR γ t se une directamente a los promotores de *il17a*, *il17f*, *ccr6* e *il23r* estableciendo así el perfil Th17⁵⁰. También ROR γ t es capaz de interactuar con moléculas como CBP (CREB-Binding Protein) o NCOA1 (Nuclear Receptor Coactivator 1), los cuales funcionan como acetiltransferasas de histona permitiendo la apertura de la cromatina⁶⁶.

Adicionalmente, el miembro de la familia ROR α también participa en la diferenciación de los linfocitos Th17 ya que este factor puede unirse a los promotores de *il17a* e *il17f* en respuesta a IL-6 y TGF- β . Los ratones *Rora*^{-/-} mostraron tener deficiencia de células T productoras de IL-17 tanto *in vitro* como *in vivo*. También se observó que en los ratones que carecen de *Rorc* y *Rora* hay una completa ausencia de las células Th17⁶⁷, lo cual demuestra el papel importante de ambos miembros ROR en la diferenciación de los linfocitos Th17.

STAT3: El transductor de la señal y activador de la transcripción 3 pertenece a la familia de las STAT, las cuales son factores de transcripción que se encuentran asociadas a receptores de citocinas y participan en la transcripción de genes involucrados en el desarrollo, crecimiento y homeostasis. La activación de STAT3 es generada principalmente por IL-6R, sin embargo, IL-21R e IL-23R son capaces de señalizar a través de esta molécula⁶⁸. El papel de STAT3 en la diferenciación de linfocitos Th17 es muy importante ya que ratones carentes de esta molécula presentan una menor frecuencia de linfocitos Th17. De manera importante STAT3 es capaz de unirse a los promotores transcripcionalmente activos de citocinas como *il17a*, *il17f*, *il-21*, *il6ra* y de los factores de transcripción *Rorc*, *Rora*, *Batf* e *Irf4*, favoreciendo el establecimiento del fenotipo Th17⁶⁹.

Runx1: Este factor pertenece a la familia de los factores de transcripción relacionados a RUNT (homólogos del gene *runt* de *Drosophila spp*) cuya participación es importante en la hematopoyesis. Además, tiene un papel durante la linfopoyesis de células T CD4 y CD8, donde Runx1 favorece la generación de linfocitos T CD8 mediante la represión de CD4 y también en la diferenciación hacia linfocitos Th17⁷⁰. El ratón carente de Runx1 es letal sin embargo, modelos *in vitro* transfectando células T CD4 con una forma de Runx1 deficiente, demostraron una reducción en el número de linfocitos T CD4 IL-17⁺ ^{70, 71}. También, Runx1 tiene la capacidad de incrementar la transcripción de ROR γ t y la producción de IL-17 bajo condiciones “Th17” polarizantes (IL-6 + TGF- β). Además de que Runx1 puede unirse directamente a promotor de *Rorc*, es capaz de interactuar con ROR γ t y promover la expresión de IL-17⁷¹.

AhR: El receptor de aril hidrocarburos es un factor de transcripción que reconoce hidrocarburos aromáticos policíclicos como la dioxina o el 6-formilindol[3,2-b]carbazol (FICZ). Después de la interacción con su ligando y la dimerización con el translocador nuclear del AhR (ARNT), se induce la expresión de algunos citocromos que participan en la detoxificación⁷². En cuanto a su papel en la biología de las células Th17, se ha visto que AhR está altamente expresado en esta población aunque el ratón carente de este receptor no tiene diferencias en las proporciones de linfocitos Th17⁷³. Sin embargo, la activación del AhR con FICZ induce la expresión de IL-17, la cual es necesaria para la producción de IL-22⁷⁴ y también se ha observado que AhR puede cooperar con ROR γ t e inducir una mayor cantidad de IL-17 e IL-22⁷⁵.

IRF4: El factor 4 regulador del interferón pertenece a la familia de los factores reguladores del interferón, cuya presencia es importante para la diferenciación de linfocitos Th2⁷⁶. Sin embargo, IRF4 también puede participar en la diferenciación de células Th17 ya que en ausencia de este factor de transcripción hay menor número de linfocitos Th17, lo que evita el desarrollo de EAE en los ratones. Además la expresión de ROR γ t es menor en estos ratones carentes, lo que sugiere que IRF4 pudiera regular la expresión de ROR γ t⁷⁷.

BATF: el factor de transcripción de cremallera de leucina básico similar a ATF pertenece a la familia de los factores de transcripción AP-1. BATF se encuentra expresado en linfocitos Th1, Th2 aunque su efecto en los linfocitos Th17 también ha sido explorado. BATF participa en la diferenciación de células Th17 uniéndose a los promotores de *Rorc*, *Rora*, *Il17a*, *il22* y *Ahr*. De acuerdo con esto, los ratones *Batf*^{-/-} son resistentes a desarrollar EAE y los números de células T CD4⁺ IL-17⁺ se encuentran disminuidos⁷⁸. Estos datos sugieren que BATF también puede estar arriba de ROR γ t en la polarización de las células Th17.

Linfocitos Th17 en psoriasis

La presencia y participación de los linfocitos Th17 en la psoriasis ha sido propuesta gracias a la evidencia obtenida de los modelos animales así como en pacientes. Por ejemplo, utilizando un ratón que expresa IL-23 de manera constitutiva bajo el promotor de la queratina 14 o bien la inyección subcutánea de esta citocina generan lesiones cutáneas similares a las observadas en los pacientes. Este modelo reveló un mayor infiltrado de células T, una activación parcial de las células de Langerhans así como una alta capacidad aloestimulante^{79,80}. También se ha reportado el incremento del ARNm de IL-23 en la dermis lesionada de los pacientes, lo que podría favorecer la presencia de células Th17⁸¹. Adicionalmente, el incremento de IL-6 e IL-8 en los queratinocitos así como de ICAM-1 y HLA-DR en linfocitos T en respuesta a IFN- γ e IL-17⁸² dieron pauta a un posible papel de los linfocitos Th17 en la psoriasis.

Uno de los mecanismos de participación de los linfocitos Th17 en la psoriasis es la activación de queratinocitos a través de la IL-17. Por ejemplo, la expresión del mensajero de la quimiocina CCL20 se incrementa en queratinocitos estimulados *in vitro* e *in vivo* con IL-17 o IL-22, lo cual favorece el reclutamiento de linfocitos T al sitio de la lesión⁸³. Este eje CCL20/CCR6 es característico de las células Th17 y es importante para la generación de las lesiones, ya que en ratones *Ccr6*^{-/-} no se generan lesiones psoriásicas⁸⁴. Por su parte, la IL-17F induce la expresión del mensajero de IL-6 en queratinocitos de humano y de ratón, lo que podría estar reforzando el perfil Th17 en la piel⁸⁵. También se ha observado que la estimulación de queratinocitos con medio obtenido de células polarizadas hacia el perfil Th1 y Th17 induce la expresión del ARNm de los péptidos antimicrobianos DEFB4 (Beta 4 Defensin) y calprotectinas como S100 A7, A8 y A9⁸⁶. Estos péptidos antimicrobianos también se incrementan así como el mensajero de las quimiocinas CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CCL20 cuando se estimula con IL-17 a los queratinocitos⁸⁶.

Otra citocina que aumenta la respuesta Th17 en psoriasis es TNF- α ya que induce un incremento en los mensajeros de IL-17, IL-6, IL-1 β , IL-22, algunos péptidos antimicrobianos como S100A8 y S100A9 y genera lesiones psoriasiformes⁸⁷.

Interesantemente, la presencia de IL-17 y TNF- α tiene un efecto sinérgico en la producción de péptidos antimicrobianos y quimiocinas en los queratinocitos⁸⁸. Todas estas moléculas contribuyen al ambiente pro-inflamatorio y su presencia demuestra que las células Th17 y sus citocinas efectoras son importantes en la psoriasis.

Utilizando un modelo de transferencia de células T con fenotipo CD4⁺ CD45RB⁺ CD25⁻ en un ratón con SCID (Severe Combined Immunodeficiency), se generaron lesiones psoriasiformes. Además, se encontró un incremento en la expresión de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17A/F, y de manera interesante, IL-22. Esta última es una citocina producida por los linfocitos Th17 cuya acción se ejerce en células no inmunes como son los tejidos. En modelos de ratón se ha observado que la expresión constitutiva de IL-22 induce lesiones psoriasiformes⁸⁹. También la administración de esta citocina al ratón genera manifestaciones cutáneas como la hiperplasia, acantosis y el incremento de algunas citocinas pro inflamatorias⁹⁰. En contraste, al evaluar ratones carentes de IL-22 o cuando se bloquea esta citocina no hay generación de lesiones psoriásicas y hay una menor cantidad de citocinas inflamatorias y células infiltrantes^{90,91}. Estos resultados demuestran que los linfocitos Th17 son importantes para el desarrollo de las lesiones a través de la producción de IL-17 e IL-22.

Otro modelo donde se demostró la importancia de las células Th17 fue utilizando ratones con un TCR transgénico específico para desmogleina 3 (proteína que participa en las uniones estrechas de los queratinocitos). Al diferenciar linfocitos T de este ratón hacia el perfil Th17 y transferidos a otro ratón Rag2^{-/-} se desarrollaron las lesiones psoriasiformes y un ambiente Th17, mientras que células diferenciadas al perfil Th1 no generaron cambios en la piel. De manera interesante al usar anticuerpos anti IL-17 o anti IL-23p19, los cambios histológicos así como el infiltrado celular disminuyeron considerablemente⁹².

En humanos, el estudio de los linfocitos Th17 ha sido más descriptivo. Por ejemplo, un estudio analizó la sangre periférica de cuatro pacientes con psoriasis y se observó que linfocitos T CD4 activados con PMA/Ionomicina tenían una menor producción de IL-4 y una tendencia a expresar IL-17, mientras que en piel lesionada

se encontró un incremento de linfocitos T productores de IL-17⁹³. Otro trabajo en pacientes reveló que los linfocitos T CD4 dependen de NF-κB y STAT3 para producir IL-17, IL-22, TNF-α, IFN-γ o de manera simultánea IFN-γ/IL-17 e IL-17/IL-22 en respuesta a PMA/Ionomicina⁹⁴. Adicionalmente, en sangre periférica de pacientes existe un incremento de las células T CD4 y CD8 productoras de IL-22 así como del AhR, un regulador de la expresión IL-22^{18,95}. Además de las citocinas efectoras del perfil Th17, en la dermis lesionada (LS) existen células dendríticas capaces de diferenciar *in vitro* a linfocitos T naive hacia un perfil Th1 y Th17⁹⁶, sugiriendo que en dermis LS están las condiciones necesarias para favorecer el perfil Th17.

En otro trabajo se analizó los linfocitos T que expresan el marcador CD146 (molécula de adhesión) encontrándose incrementados tanto en sangre periférica como en piel lesionada de pacientes con psoriasis. Las células T CD4⁺ CD146⁺ mostraron un fenotipo de memoria (CD45RO⁺) y después de ser estimuladas con PMA/Ionomicina tuvieron una mayor expresión de IL-17 y de RORγt en comparación con las CD146⁻, sugiriendo que son una fuente importante de IL-17, con potencial de contribuir en la psoriasis⁹⁷. En conjunto estas evidencias muestran que las citocinas efectoras de los linfocitos Th17 tienen un papel importante en la fisiopatología de la psoriasis.

Plasticidad de linfocitos Th

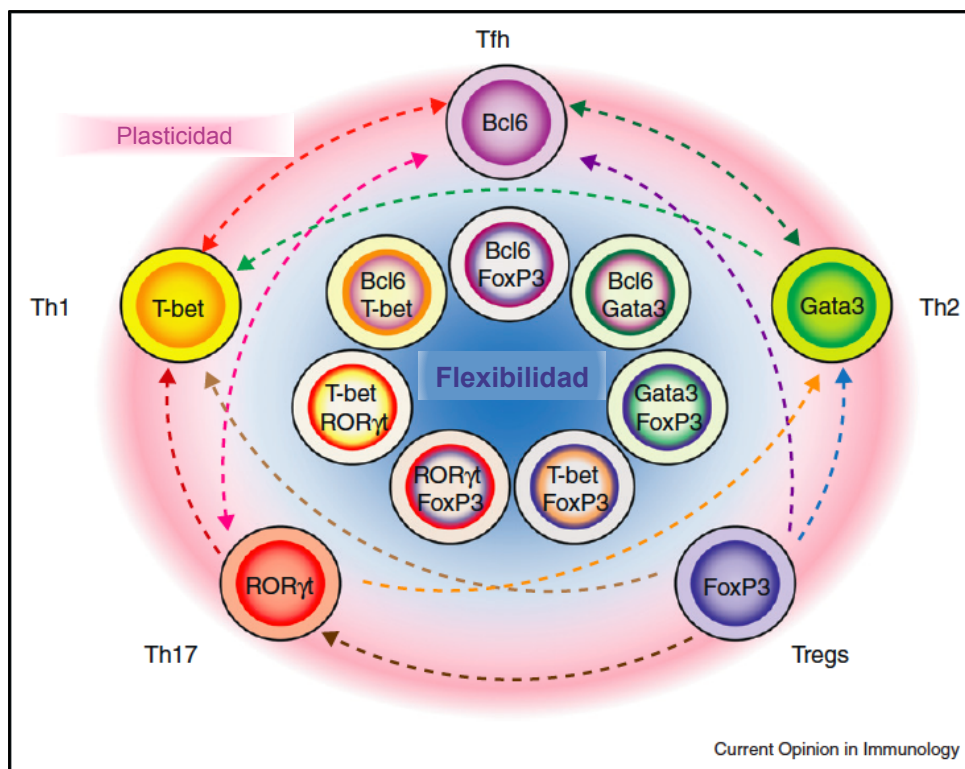
El concepto de plasticidad ha sido relevante en los últimos años para poder entender las diferentes respuestas de los linfocitos T, sobre todo en procesos inflamatorios crónicos. Al descubrirse que los linfocitos T podían tener funciones efectoras específicas determinadas (perfil Th1 y Th2), se propuso la clasificación de los Th. De tal modo se logró la identificación de poblaciones Th como las Th17, Th9, Th foliculares y las T reguladoras, cada una de ellas caracterizada por citocinas efectoras y factores de transcripción que controlan su función.

Además de tener funciones específicas, se observó que el proceso de diferenciación entre los linfocitos Th1 y Th2 podría ser excluyente uno del otro ya que los linfocitos

Th2 al expresar GATA3 (GATA-binding protein 3) reprimen la expresión de STAT4, lo que disminuye su capacidad de responder a IL-12⁹⁸. Por su parte, los linfocitos Th1 al expresar T-bet, pueden regular negativamente la expresión de GATA3, restringiendo el potencial de diferenciación Th2⁹⁹. En el caso de los linfocitos Th17, la IL-2 disminuye su diferenciación y la presencia de IFN- γ reduce la producción de IL-17, sugiriendo que el perfil Th1 regula negativamente la diferenciación hacia el perfil Th17^{100,101}.

A pesar de estas evidencias, observaciones realizadas en diversos modelos de inflamación crónica revelaron la existencia de células Th que podían expresar simultáneamente dos citocinas de diferente perfil. Por ejemplo, se encontró que las células Th2 pueden expresar IFN- γ después de una infección viral¹⁰² o que los linfocitos T foliculares pueden co-expresar T-bet, GATA3 o ROR γ t, lo cual sugiere que son células con gran plasticidad. Por ejemplo, las células reguladoras FoxP3⁺ son capaces de adquirir características de Th1 como son la expresión de IFN- γ y de CXCL3 o características del perfil Th17 como la expresión de ROR γ t e IL-17¹⁰³. Los linfocitos Th17 han mostrado tener una gran plasticidad, ya que son capaces de adquirir características de célula Tr1 en un modelo de inflamación intestinal¹⁰⁴ (Figura 4).

Particularmente, la condición de plasticidad en los linfocitos Th17 hacia un perfil Th1 se ha encontrado en diversos trabajos. Por ejemplo, la diferenciación de células Th17 *in vitro* y su posterior estimulación vía TCR demostró la presencia de células T CD4⁺ con la capacidad de producir IL-17 e IFN- γ simultáneamente¹⁰³. El modelo de EAE demostró que la plasticidad entre los fenotipos Th17 y Th1 se da en ese sentido y no al revés. Utilizando un ratón reportero de IL-17, se observó que los linfocitos que producen simultáneamente IL-17/IFN- γ primero expresaron IL-17 y después IFN- γ , lo cual sugiere que la plasticidad ocurre en las células Th17¹⁰⁵.



Nakayamada S. Et. al. Current Opinion in Immunology (2012)

Figura 4. Plasticidad de los linfocitos T cooperadores. Las funciones los linfocitos T cooperadores son específicas y están controladas por la expresión de factores de transcripción maestros. Sin embargo, se ha observado que un linfocito Th diferenciado puede tener plasticidad y expresar más de un factor de transcripción diferente al adquirido durante su polarización. Esta plasticidad hace posible la generación de poblaciones con capacidad de co-producir citocinas de dos diferentes perfiles Th, o inclusive cambiar su fenotipo hacia un perfil diferente. Las flechas indican dirección de la plasticidad encontrada entre los diversos perfiles de linfocitos Th.

Los estudios en humanos también revelaron la existencia de células T productoras de IL-17/ IFN- γ . En biopsias de pacientes con enfermedad de Crohn se observó que la estimulación de células T CD4 con PMA/Ionomicina induce la producción de IL-17, IFN- γ así como una gran proporción de células productoras de ambas citocinas¹⁰⁶. En pacientes con autoinmunidad avanzada de células beta se encontró una elevada frecuencia de linfocitos T CD4 IL-17⁺/IFN- γ ⁺ en sangre periférica en comparación con sujetos sanos, correlacionando positivamente con la concentración de glucosa en sangre. Además, estos linfocitos presentaron niveles similares del ARNm de IFN- γ en comparación con las células T CD4 productoras sólo de IFN- γ ¹⁰⁷.

En otra patología crónica inflamatoria como la esclerosis múltiple, se encontró la presencia de células T CD4 en sangre periférica que co-expresaban IL-17 e IFN- γ , las cuales son reclutadas a cerebro y cuya frecuencia es mayor en aquellos pacientes que tuvieron una recaída¹⁰⁸.

La presencia de estas células con plasticidad también ha sido encontrada en los pacientes con psoriasis. Usando CD161 como marcador de células Th17, se encontró en dermis lesionada la presencia de linfocitos Th17 (CD4⁺ CD161⁺) que expresan simultáneamente IL-17 e IFN- γ ¹⁰⁹. Además, estas células dobles productoras de citocinas están presentes en sangre periférica⁹³ de los pacientes y en dermis lesionada, siendo su frecuencia mayor en la dermis lesionada comparado con sujetos sanos⁹⁴. También se ha encontrado que las células dendríticas dermales de las lesiones son capaces de inducir la co-expresión de IL-17 e IFN- γ en linfocitos T CD4⁺⁹⁶, lo que sugiere que las células Th17 en pacientes con psoriasis tienen la plasticidad de adquirir características Th1.

Mecanismos reguladores en la plasticidad de linfocitos Th17 hacia el perfil Th1

Se ha propuesto que la plasticidad de las células Th17 está controlada por la expresión de factores de transcripción, los cuales definen el conjunto de citocinas y moléculas que expresa los linfocitos Th17. Además, se ha considerado que el estado epigenético de la cromatina contribuye con la adquisición de estas nuevas características de plasticidad, como la expresión de IFN- γ en células Th17.

Regulación epigenética

La regulación epigenética de la plasticidad se observó en linfocitos Th17 diferenciados con IL-6 y TGF- β encontrándose las marcas epigenéticas H3K4me3 y H3Ac en el promotor de *il17f* e *il23r*, las cuales favorecen la expresión de estas moléculas¹¹⁰. Interesantemente en linfocitos Th17 se encontró que el promotor de *Tbx21* contiene regiones con la marca H3K4me3, lo que permite su transcripción mientras que el gene de *ifng* tiene muy pocas marcas represoras H3K27me3^{110,111}. Estos trabajos reflejan la susceptibilidad de las células Th17 a adquirir

características de plasticidad hacia el perfil Th1 debido al estado de la cromatina en el locus Th1.

Otro trabajo mostró que los linfocitos Th17 estimulados con IL-23 incrementaban la producción de IFN- γ además de ser capaces de responder a IL-12 generando un aumento en la expresión de IFN- γ y un abatimiento de IL-17, lo cual fue dependiente de T-bet y STAT4¹¹². Estas características pueden ser explicadas por los cambios generados en la cromatina ya que al estimular las células Th17 con IL-12 se induce un incremento de la marca represora H3K27me3 en el loci de *il17* y *Rorc* así como el aumento en la marca promotora H3K4me3 en el loci de *ifng*. Además se observó que IL-12 promueve la unión de STAT4 en el promotor de *ifng*, favoreciendo la plasticidad de los linfocitos Th17¹¹³. Aunado a las modificaciones epigenéticas, recientemente se ha propuesto que la arquitectura de la cromatina pudiera influenciar la expresión de IFN- γ , debido a que los elementos enhancers podrían encontrarse mas cercanos al loci de *ifng* en las células Th17 comparado con otras células Th¹¹⁴.

Regulación Transcripcional

La expresión de los factores de transcripción es determinante para la función de los linfocitos T. Experimentos *in vitro* con líneas celulares de linfocitos T obtenidos de pacientes con enfermedad de Crohn revelaron la co-expresión de los factores de transcripción ROR γ t y T-bet, lo cual podría explicar su capacidad de producir ambas citocinas¹⁰⁵. Sin embargo, el factor de transcripción Runx1 es determinante para la producción de IL-17 o de IFN- γ en las células Th17, ya que Runx1 puede formar dímeros con ROR γ t y favorecer la expresión de IL-17, pero, en presencia de T-bet, se forma un dímero Runx1/T-bet el cual reprime la expresión de ROR γ t y bloquea la diferenciación hacia el perfil Th17¹¹⁵. Además, la estimulación de linfocitos Th17 con IL-12 induce la expresión de Runx1 que, junto con T-bet, promueve la expresión de *ifng*¹¹⁶.

Otro ejemplo de regulación por factores de transcripción es el observado en el IL-23R, que señala a través de los factores STAT3 y STAT4, los cuales favorecen el

perfil Th17 y Th1 respectivamente. En el modelo de colitis se demostró que el IL-12R β no es necesario para la inducción de la patología pero si la presencia de STAT4. Se sabe que esta patología es mediada por IL-23, lo que sugiere que la IL-23 pudiera activar a STAT4 y favorecer las características Th1 en los linfocitos Th17¹¹⁷. En conjunto esta evidencia muestra que las células Th17 tienen gran plasticidad sobre todo en condiciones inflamatorias. Esto les permite adquirir características Th1 dependiendo del estado de la cromatina así como de los factores de transcripción expresados en un momento determinado.

Linfocitos Th17 convencionales y patogénicos

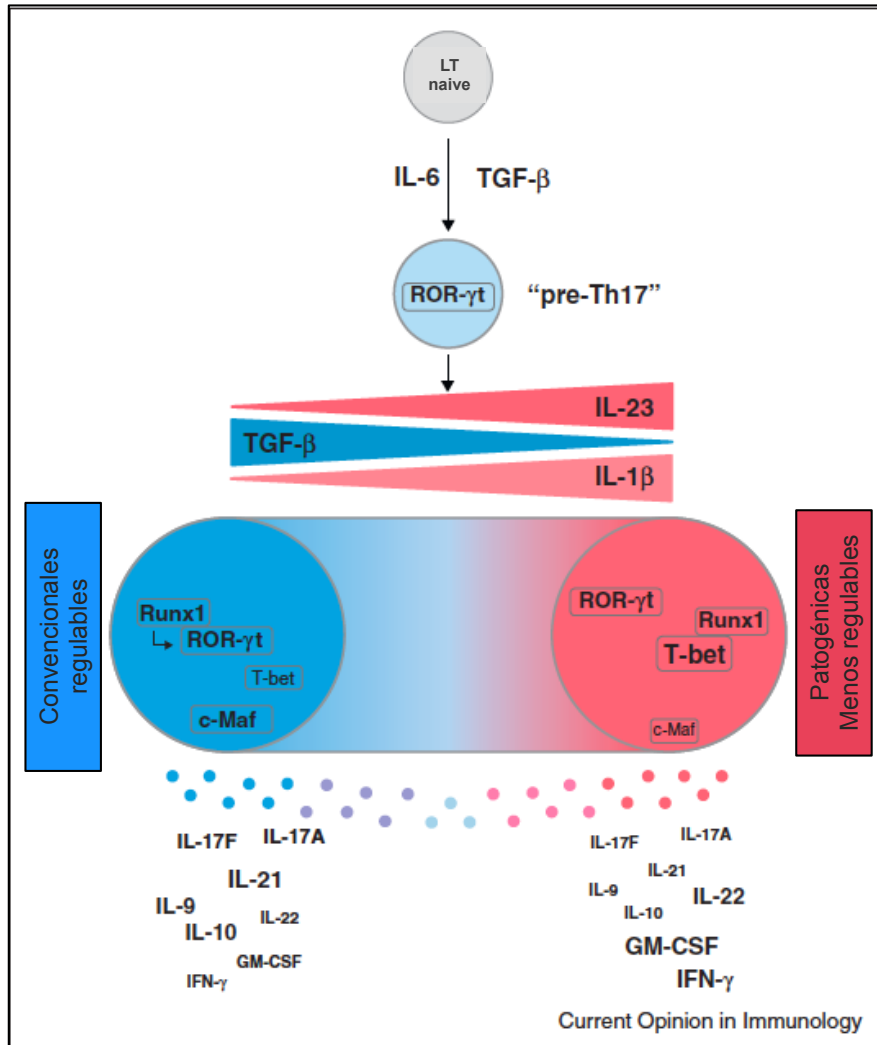
Derivado de los estudios de la EAE fue posible establecer que los linfocitos T CD4 productores de IL-17/IFN- γ agravan la enfermedad cuando son transferidos a otro ratón con EAE, por lo que se consideraron como linfocitos patogénicos¹¹⁸. Utilizando este mismo modelo, se demostró que las células Th17 diferenciadas *in vitro* con IL-23 son más patogénicas que las diferenciadas con TGF- β , lo que sugería la existencia de dos poblaciones de linfocitos Th17¹¹¹. Además de la IL-23, se encontró que la IL-1 β es importante para la adquisición de las características patogénicas, ya que su ausencia genera una menor frecuencia de células T CD4⁺ productoras de IL-17/IFN- γ ¹¹⁹. Además del modelo de EAE, se ha demostrado que la transferencia de células Th17 que adquirieron las características de Th1 son altamente patogénicas en modelos de colitis y de diabetes^{117,119}.

De manera interesante la adquisición de características patogénicas también puede ser generada por infecciones con microorganismos donde la respuesta Th17 es importante. Por ejemplo, se ha encontrado que la infección con *C. rodentium* induce un incremento de células T CD4⁺ dobles productoras de IL-17 e IFN- γ , lo que correlaciona con un mayor daño al intestino. Este mismo estudio reveló que al día 25 posterior a la infección, los linfocitos T CD4⁺ incrementan los mensajeros de los factores de transcripción Ror α , T-bet, Runx3 así como de IFN- γ ¹²⁰, lo que sugiere la adquisición de características patogénicas.

Otro estudio utilizando una infección con *H. hepaticus* en un ratón carente de IL-10 mostro resultados similares, encontrándose un incremento de linfocitos Th dobles productores de IL-17 e IFN- γ provenientes de intestino. En el día 14 después de la infección se observó un mayor daño al intestino y un mayor infiltrado de estos linfocitos IL-17⁺/IFN- γ ⁺, los cuales pueden ser detectados hasta 91 días después de la infección¹²¹. En humanos, se ha demostrado que linfocitos T CD4⁺ naive en presencia de *C. albicans* o *S. aureus* adquieren características patogénicas como la doble producción de IL-17 e IFN- γ . Además, la estimulación con estos microorganismos induce la expresión de ROR γ t y, de manera interesante, la expresión de los mensajeros de T-bet e IFN- γ en los linfocitos T CD4⁺ IL-17⁺¹²². En conjunto estos resultados muestran que las características patogénicas pueden ser inducidas por infecciones con microorganismos y que pueden correlacionar con el daño observado en los tejidos durante la inflamación crónica.

Con base en la evidencia, se propuso la existencia de dos poblaciones de linfocitos Th17 denominadas como “convencionales” y “patogénicos”, las cuales difieren en las citocinas polarizantes, factores de transcripción y citocinas efectoras. La población de linfocitos Th17 convencionales se genera en presencia de IL-6 y TGF- β , expresan ROR γ t, producen IL-17, IL-21 y citocinas reguladoras como IL-9 e IL-10. La otra población denominada como patogénicos se genera en presencia de IL-6 en combinación con IL-23 o IL-1 β , expresan ROR γ t, T-bet, Runx1, producen IFN- γ , IL-22, GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) y pueden mantener o inclusive perder la producción de IL-17¹²³ (Figura 5).

Posteriormente se describió que existen diversas combinaciones de citocinas para la generación de linfocitos Th17 patogénicos *in vitro* como IL-6 + TGF- β 3, IL-6 + IL-1 β , IL-6 + IL-23 o IL-6 + IL-1 β + IL-23. Al comparar el transcriptoma de las células generadas en cada una de estas condiciones con el de los linfocitos Th17 convencionales (IL-6 + TGF- β 1), se observó que las células patogénicas tenían semejanzas entre ellas y además son diferentes con respecto a las convencionales. Dentro de los genes que se incrementan en las células patogénicas están *Tbx21*, *il23r*, *Csf2*, *il3*, *Cxcl3* e *il22* mientras que disminuye la expresión de *il10*¹²⁴.



Peters A. Et. al. Current Opinion in Immunology (2011)

Figura 5. Generación de linfocitos Th17 convencionales y patogénicos. La diferenciación de los linfocitos T naive hacia el perfil Th17 requiere de la presencia de IL-6 y del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β). Sin embargo, de acuerdo al microambiente presente se ha propuesto la generación de dos subpoblaciones de linfocitos Th17 denominados como convencionales (azul) y patogénicos (rojo). Ambos fenotipos difieren en las citocinas que producen, los factores de transcripción que expresan y su capacidad de ser reguladas.

Otra de las diferencias entre estas poblaciones de células Th17 es respecto a su capacidad proliferativa. Se ha encontrado que los linfocitos Th17 convencionales tienen baja capacidad proliferativa, aún en presencia de IL-2 y estimulación vía TCR. Esto es debido a la expresión del gene 1 inducido por IL-4 (IL4I1), el cual está gobernado por ROR-γt y disminuye la expresión de CD3 épsilon, generando una menor activación¹²⁵. Además, IL4I1 mantiene la expresión de Tob1 el cual pertenece

a una familia de proteínas que bloquean la proliferación celular después de la estimulación del TCR¹²⁶. En el caso de las células Th17 patogénicas se ha observado que tienen una mayor capacidad proliferativa así como una alta resistencia a ser reguladas por los linfocitos T reguladores¹²⁷.

Un estudio reciente muestra que puede haber similitudes así como una gran heterogeneidad entre las células Th17 generadas *in vivo* (a través de EAE) e *in vitro* (citocinas polarizantes). Los resultados han permitido identificar nuevas moléculas que pueden regular la patogenicidad de las células Th17 como son TOSO (Faim3, Fas-inhibitory molecule 3, por sus siglas en inglés) y el factor de transcripción PLZP (Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein)¹²⁸.

La familia de las células linfoides innatas

Los linfocitos T cooperadores tienen una gran importancia en el sistema inmune debido a que producen citocinas que potencian, mejoran y regulan la actividad de las células inmunes innatas así como de los tejidos. Esta conexión inmunidad adaptativa-innata es necesaria para la protección del organismo, aunque también es un elemento clave en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas como la psoriasis.

Sin embargo, los linfocitos Th no son las únicas células linfoides capaces de expresar las citocinas cooperadoras. Recientemente se ha descrito un grupo de células también pertenecientes a la rama linfoide, las cuales comparten características fenotípicas y funcionales con los linfocitos Th. Estos linfocitos innatos (ILC), a diferencia de las células Th, tienen características innatas, ya que su activación y sus funciones efectoras no dependen del reconocimiento mediado por receptores clonales. Debido a la gran similitud con los linfocitos Th, las células linfoides innatas han sido estudiadas en un contexto inmunológico protector así como en el inmunopatológico, revelando su papel en el sistema inmune.

Características, origen y diferenciación de las células linfoides innatas

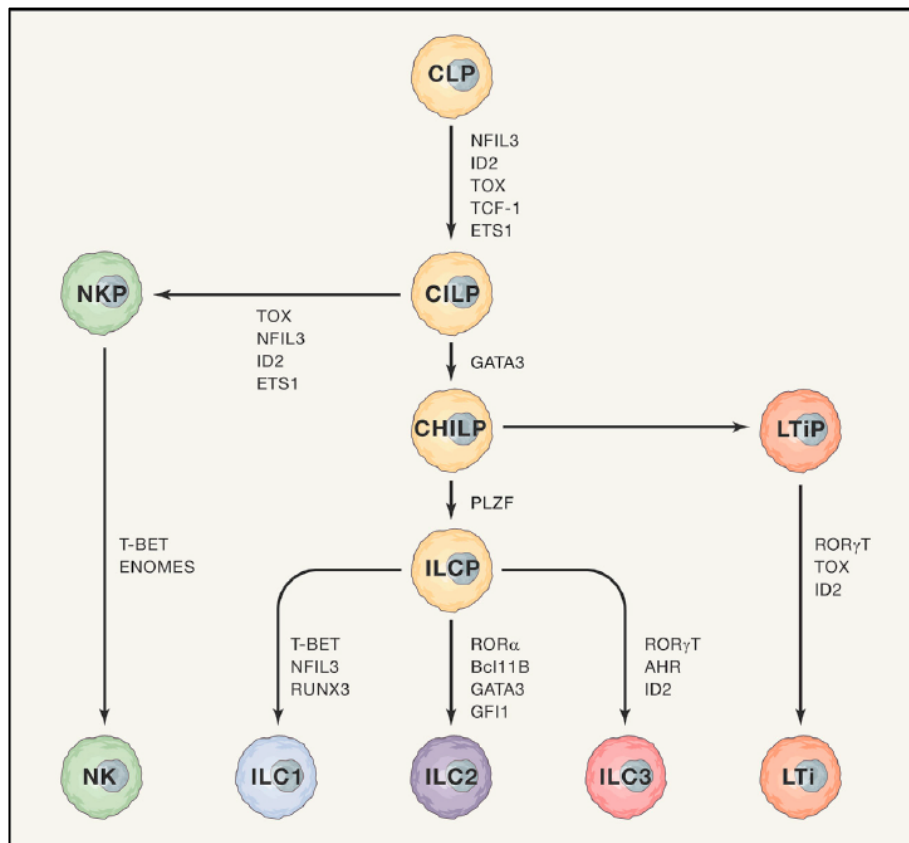
Las células linfoides innatas son células hematopoyéticas pertenecientes al linaje linfoide las cuales poseen similitudes con los linfocitos T. Clásicamente se define a una ILC con base en cuatro características principales que son: 1) Poseer morfología linfoide, 2) No presentar receptores clónales específicos para antígenos (ausencia de BCR o TCR), 3) Carecer de marcadores presentes en células progenitoras (CD34), células eritroides (Ter-119), linfocitos T (CD3), monocitos (CD14), linfocitos B (CD19) y células dendríticas (HLA-DR) y 4) Expresar la cadena alfa del receptor de IL-7 (CD127)¹²⁹.

La diferenciación de las ILC es un proceso complejo que involucra la expresión y represión de factores de transcripción donde gracias a los modelos en ratón ha sido posible dilucidar su desarrollo. Al igual que las células T, las ILC provienen del Progenitor Linfoide Común (CLP) el cual está presente en medula ósea. La diferenciación de las ILC requiere de la expresión de los factores de transcripción TCF1 (T Cell Factor 1) y NFIL3 (Nuclear Factor IL-3-Regulated) lo que genera el Progenitor Linfoide Innato Común (EILP).

El EILP expresa en su superficie la integrina $\alpha 4\beta 7$ así como CD127 y es capaz de dar origen a las poblaciones linfoides innatas “cooperadoras (ILC) y citotóxicas (NK)”. Posteriormente la expresión de los factores Id2 (DNA-binding inhibitor protein 2) y PLZF (Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger) inducen el compromiso hacia las poblaciones “cooperadoras” a través del Progenitor ILC común cooperador (CHILP). Finalmente, dependiendo del factor de transcripción que se exprese este CHILP puede dar origen a las células linfoides innatas del grupo 1 (ILC1), grupo 2 (ILC2), grupo 3 (ILC3) y a las células inductoras de tejido linfoide (LTi)^{130,131,132}. En el caso de humanos, se ha descrito la presencia de una célula con fenotipo $ROR\gamma t^+$, $CD34^+$, $CD45RA^+$, $CD117^+$, $IL-1R^+$ la cual está presente en órganos linfoides secundarios y es capaz de diferenciarse hacia todos los tipos de ILC incluyendo células NK¹³³.

Con respecto a su clasificación, las ILC eran nombradas de acuerdo al grupo de trabajo que las describía, haciendo difícil su clasificación. Posteriormente se llegó a

un consenso y con la información que se tenía en el año 2013, las ILC se clasificaron en tres grupos denominados como ILC1,2 y 3 dentro de los cuales se englobaron las células NK (ILC1) y las LTi (ILC3)¹³⁴. Sin embargo, con base en las rutas de diferenciación que siguen las ILC, en el 2018 se propuso que estas pueden ser clasificadas en 5 grupos que son NK, ILC1, ILC2, ILC3 y LTi¹³⁵ (Figura 6).



Vivier E. Et. al. Cell (2018)

Figura 6. Desarrollo y poblaciones de ILC. El desarrollo de las ILC está basado en evidencia obtenida de modelos de ratón. Las ILC se originan a partir del precursor linfocítico común (CLP) que reside en medula ósea. Posteriormente se adquiere el compromiso al linaje ILC en el precursor común de ILC (CILP). A partir de esta célula se generan dos progenitores, el de células NK (NKP) y el progenitor común de las ILC cooperadoras (CHILP). El primer progenitor da origen a las células NK mientras que el segundo precursor genera el precursor de ILC (ILCP), las ILC1,2 y 3 y el precursor de las células inductoras de tejido linfocítico (LTiP) y las LTi. Cada una de las etapas de diferenciación están reguladas por factores de transcripción específicos.

Células Natural Killer

Las células NK fueron las primeras ILC caracterizadas y su función es la inducción de lisis en células infectadas por virus¹³⁶ y células tumorales¹³⁷. Para su desarrollo, las NK requieren de la expresión de los factores de transcripción T-bet y de Eomes, los cuales regulan la expresión sus citocinas efectoras IFN- γ y TNF- α así como de la maquinaria citotóxica. En humanos, las células NK están presentes en sangre e hígado y pueden recircular desde los tejidos. El fenotipo de las células NK es T-bet⁺ Eomes⁺ NKG2D⁺ NKp44⁺ CD25⁺, CD122⁺ IL-12R β 1⁺ y recientemente se propuso que NKp80 es otro marcador exclusivo de las NK¹³⁵.

Células linfoides innatas del Grupo 1

Las ILC1 son consideradas la contraparte innata de los linfocitos Th1 y su desarrollo depende de la expresión de factor de transcripción maestro T-bet, lo que permite la expresión de las citocinas efectoras IFN- γ y TNF- α . Las ILC1 carecen de actividad citotóxica debido a la baja expresión de perforina y se ha reportado que son importantes en infecciones contra microorganismos intracelulares como *Toxoplasma gondii* o *Clostridium difficile*. El mecanismo de activación de las ILC1 involucra la presencia de citocinas como IL-12, IL-15 e IL-18 las cuales provienen de las células dendríticas o de células no inmunes como células reticulares. Las ILC1 son residentes de tejido y se localizan principalmente en amígdala, intestino, hígado, decidua y piel. Con respecto a la expresión de marcadores, las ILC1 tienen el fenotipo T-bet⁺ CD127⁺ CD49a⁺ TRAIL⁺ CD161⁺ ICOS⁺ y KLRG1⁺¹³⁸.

Células linfoides innatas del grupo 2

Las ILC2 son la contraparte innata de los linfocitos Th2 y para su desarrollo requieren de IL-7 así como de los factores de transcripción GATA3, BCL11B (B-cell lymphoma/leukemia 11B) y GFI1 (Growth Factor Independet-1)¹³⁹. Las citocinas efectoras de las ILC2 son IL-4 (solo en humanos), IL-5, IL-9, IL-13 y amfirregulina mientras que su activación depende de citocinas presentes como IL-25, IL-33 y TSLP (Thymic Stromal Lymphopietin). Dentro de sus características fenotípicas se

encuentran la expresión de CD25, GATA3, CD127, CD161, CRTH2, IL-33R, IL-17RB (IL-25R) e ICOS entre otros¹⁴⁰. Estas células residen en diferentes tejidos periféricos como intestino, glándulas salivales, pulmón y piel. Sus funciones principales en inmunidad comprenden la respuesta en contra de parásitos, mediado por la generación de eosinofilia, la producción de moco y el incremento de la motilidad intestinal^{141,142}. También se ha documentado su participación en la regeneración de tejido pulmonar después de infecciones por el virus de influenza A a través de la producción de amfirregulina¹⁴³.

Células linfoides innatas del grupo 3

Este grupo de ILC requiere para su diferenciación la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y AhR los cuales controlan la producción de las citocinas IL-17 e IL-22, por lo que las ILC3 se consideran la contraparte innata de los linfocitos Th17¹⁴⁴. Las ILC3 se encuentran principalmente en criptoplasmas, placas de Peyer, lamina propia, piel, pulmones y se activan en respuesta a IL-1 β e IL-23¹⁴⁵. Fenotípicamente, estas células pueden ser clasificadas como NCR⁺ y NCR⁻ (de acuerdo a la expresión de NKp44 y NKp46) aunque ambas poblaciones tienen el fenotipo ROR γ t⁺, CD117⁺, CCR6⁺, IL-1R1⁺ e IL-23R⁺. Una diferencia funcional observada entre estas dos poblaciones es que las ILC3 NCR⁺ son capaces de expresar IL-17 e IL-22 mientras que las NCR⁻ solo producen IL-22¹⁴⁶. Las ILC3 participan en la eliminación de bacterias extracelulares como *C. rodentium*¹⁴⁷ así como en respuestas contra hongos como *C. albicans* mediante la inducción de péptidos antimicrobianos. También pueden promover la integridad de la barrera intestinal a través de la producción de IL-22 y se ha observado que células ILC3 MHC-II⁺ son capaces de presentar antígenos de la microbiota intestinal a linfocitos T, favoreciendo su anergia, y promoviendo así la tolerancia intestinal¹⁴⁸.

Células inductoras de tejido linfoide

En 1997 se descubrió a las LTi las cuales mostraban morfología linfoide, dependían del factor de transcripción ROR γ t y eran necesarias para el desarrollo de órganos linfoides secundarios¹⁴⁹. Las LTi son importantes en la generación de ganglios

linfáticos periféricos, mesentéricos, placas de Peyer y las criptoplasmas ya que en respuesta a TNF- α producen linfotóxica $\alpha 1\beta 2$. Esta linfotóxica induce la expresión de moléculas de adhesión en las células estromales mesenquimales, favoreciendo la formación de los órganos linfoides^{145,150}. Las LTi residen en los órganos linfoides secundarios y aunque su papel en infecciones no se ha documentado, se sabe que son importantes en la regeneración de los órganos linfoides después de infecciones virales¹⁵⁰.

Las ILC son importantes en la respuesta inmune contra diversos patógenos así como parte esencial en la regeneración y mantenimiento de las mucosas. Sin embargo, estas células también han sido asociadas a procesos inflamatorios crónicos y se ha propuesto que las ILC tienen un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias¹⁵¹.

ILC en condiciones inflamatorias

Las ILC son células innatas que residen en los tejidos, son capaces de activarse con citocinas inflamatorias, producen citocinas similares a los linfocitos Th, favoreciendo la activación de epitelios y células inmunes, con lo cual se podría explicar su participación en inflamación. Debido a las similitudes funcionales entre los linfocitos Th y las ILC es que se pudo considerar su participación en enfermedades inflamatorias crónicas.

Las células ILC1 se han estudiado en enfermedades inflamatorias crónicas como enfermedad de Crohn donde se encontraron incrementadas en el íleon de los pacientes en comparación con sujetos sanos. Además, las células ILC1 son capaces de secretar IFN- γ en respuesta a IL-12 e IL-15 con lo cual podrían tener el potencial de contribuir a la inflamación local¹⁵². En pacientes con esclerosis sistémica, se encontró incrementada una población no clásica de ILC1 caracterizada por la expresión de CD4 y que produce IFN- γ , GM-CSF y TNF- α en respuesta a PMA/ionomicina¹⁵³. Utilizando un modelo de obesidad en ratón se encontró que hay células ILC1 residentes en tejido adiposo y que se incrementan después de una dieta alta en grasas. Además, estas células producen IFN- γ favoreciendo la

polarización de macrófagos hacia un perfil M1 y generando resistencia a la insulina¹⁵⁴.

De acuerdo al perfil de citocinas que producen, las células ILC2 han sido asociadas a procesos inflamatorios alérgicos en vías respiratorias. Por ejemplo, la degranulación de basófilos y células cebadas en respuesta a alérgenos, proteasas en infecciones virales puede llevar a la activación de ILC2 mediante la producción de IL-33 y la prostaglandina D2¹⁵⁵. En humanos, las ILC2 se encuentran incrementadas en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y requieren de IL-4 para mantener su fenotipo. Además, en sujetos con alergia las ILC2 son capaces de infiltrar el pulmón y son las principales productoras de IL-13¹⁵⁶. Así mismo pacientes con pólipos nasales y rinosinusitis crónica muestran un incremento de ILC2, las cuales son capaces de producir IL-4 e IL-5 en respuesta a IL-25 e IL-33¹⁵⁷, sugiriendo que esta población favorece la activación y reclutamiento de eosinófilos en el sitio de inflamación. También en sujetos con alergia al pasto o al acaro del polvo muestran elevadas frecuencias de ILC2 en sangre periférica en comparación con sujetos sanos¹⁵⁸.

Otro trabajo demostró que la administración de IL-2 en ratones RAG^{-/-} genera la activación de las ILC2 y el desarrollo de lesiones similares a las observadas en dermatitis atópica¹⁵⁹. Este mecanismo junto con la alta expresión de IL-33R, IL-17RB, CRTH2 y TSLPR observada en las ILC2 podría explicar el incremento en esta población en la dermis lesionada de los pacientes con dermatitis atópica¹⁶⁰.

Con respecto a las ILC3 hay diversos modelos que demuestran su participación en condiciones inflamatorias crónicas. Por ejemplo, en el modelo de colitis inducida por la inoculación de *Helicobacter pylori* se encontró que la patología es dependiente de ILC3 productoras de IL-17 que responden a IL-23¹⁶¹. También se demostró que la presencia y producción de IL-17 por parte de los linfocitos T y de las ILC es dependiente de IL-1 β ¹⁶². En un modelo de asma inducida por obesidad se encontró que las ILC3 proliferan en respuesta a IL-1 β producida por macrófagos dependiente de inflamasoma NLRP3¹⁶³. Con respecto a los humanos, se ha observado un incremento de ILC3 en el íleon de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal así como en lavado broncoalveolar de sujetos con asma, sugiriendo su posible

participación en estas patologías¹⁶⁴. También se ha encontrado en sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple un incremento de ILC3 NCR⁺ y en pacientes con inmunodeficiencia común variable hay mayor presencia de una población con fenotipo CD3⁻ ROR γ t⁺ IFN- γ ⁺ en biopsias de pulmón e intestino¹⁶⁵. Recientemente en el líquido sinovial de pacientes con artritis psoriásica se observó un incremento de ILC3 CCR6⁺ NKp44⁺ capaz de expresar IL-17¹⁶⁶. Todos estos trabajos sugieren la posible implicación de las ILC en condiciones inflamatorias, sin embargo aun queda por determinar los mecanismos por los cuales participan estas células en las distintas patologías.

ILC en psoriasis

Los trabajos que abordan el estudio de las ILC en la psoriasis son pocos. Uno de los primeros reportes realizado en un modelo de ratón, se analizaron las lesiones generadas por la administración de imiquimod (un modelo ampliamente utilizado para estudiar esta enfermedad). Se encontró que la generación de lesiones psoriásicas es dependiente de una población linfocítica que expresa IL-17 e IL-22. Además, esta población es dependiente de la cadena gamma común y de ROR γ t pero independiente de la enzima RAG, revelando que las ILC3 son importantes en la fisiopatología¹⁶⁷.

Los estudios realizados en pacientes con psoriasis son más recientes. Las frecuencias de ILC en piel sana muestran que las ILC2 son las más abundantes seguidas por las ILC3 NCR⁻ y finalmente las ILC1. En pacientes con psoriasis, hay un incremento de la población ILC3 y una disminución en ILC2 en la piel lesionada y sin lesión con respecto a piel de sujetos sanos. Otro hallazgo es el incremento en la expresión de MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) en la piel lesionada, lo cual podría favorecer la lisis de las células y a la liberación de DAMPs contribuyendo al ambiente inflamatorio¹⁶⁸.

También se ha encontrado que la frecuencia de la población ILC3 NKp46⁺ está incrementada en dermis lesionada y sin lesión en comparación con piel sana, resultado que concuerda con el primer reporte. Además, hay células ILC3 NCR⁺ en

sangre periférica las cuales tienen una mayor expresión de la molécula CLA, misma que confiere tropismo hacia la piel en condiciones basales. Al evaluar funcionalmente a las ILC, se encontraron células CD3⁻ capaces de producir IL-17 e IL-22 después de estimulación con PMA/ionomicina¹⁶⁹. Sin embargo, al analizar de manera más específica la célula ILC productora de IL-17 e IL-22, se observó que las células ILC3 solo son capaces de producir IL-22¹⁷⁰, lo cual deja la incógnita acerca de la población linfocítica CD3⁻ que está contribuyendo con la producción de IL-17 en estos pacientes.

Poblaciones no clásicas de ILC

La identificación de las ILC es un proceso muy restrictivo debido al uso de marcadores de exclusión celular (marcadores de linaje) en combinación con marcadores clásicos como CD127. Recientemente un estudio analizó las frecuencias de ILC en pacientes con inmunodeficiencia severa combinada los cuales tenían un defecto en la cadena gamma común del receptor de IL-2, encontrando la ausencia de ILC. Posterior a un trasplante de células troncales hematopoyéticas en presencia de mielo-ablación, se observó que las frecuencias de ILC eran muy bajas, pero, interesantemente, estos pacientes no presentaron problemas de salud¹⁷¹. Estos resultados sugieren que la función de las ILC podría ser redundante con la función de los linfocitos T o que existen poblaciones alternativas de ILC que pudieran llevar a cabo las funciones de las ILC clásicas.

Los avances en el campo de las ILC han permitido encontrar y analizar poblaciones que difieren de la clasificación clásica. Por ejemplo, progenitor el EILP encargado de dar origen a todas las ILC, mostró tener una expresión baja de CD127¹⁷². En humanos, se ha observado la presencia de ILC1 con la característica fenotípica de expresar CD4, IL-6R α , la cual está incrementada en sangre periférica de pacientes con esclerosis sistémica¹⁵³.

Uno de los factores de transcripción importantes para el desarrollo de las ILC es NFIL3 cuya activación es a través de IL-7¹⁷³, aunque en su descripción inicial se reportó como un factor inducido por IL-3¹⁷⁴. Considerando estos estudios, en

nuestro grupo de trabajo nos preguntamos si existía una población con características de ILC que dependiera de la IL-3 y con el potencial de tener funciones redundantes con las ILC clásicas. En sangre periférica de sujetos sanos encontramos una población con morfología linfoide, negativa para los marcadores de linaje (CD3, CD14, CD19, CD56, CD94 y HLA-DR), con baja expresión de CD127 pero con una alta expresión de la cadena alfa del receptor de IL-3 (CD123), confiriendo el potencial de regular a NFIL3. Esta población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{bajo}}$ expresa los factores de transcripción requeridos para el desarrollo de las ILC como son Id2, NFIL3, TOX y PLZF, los cuales se incrementan después de la estimulación con IL-3. Analizando su función, encontramos que la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{bajo}}$ expresa de manera basal los factores de transcripción T-bet y ROR γ t con lo cual tienen el potencial de tener funciones de una ILC1 o ILC3. Tras su estimulación con PMA/ionomicina, esta población produce IL-2 e IFN- γ pero a pesar de expresar ROR γ t no se detectó producción de IL-17 e IL-22¹⁷⁵.

Algunos autores proponen que las ILC en sangre periférica no cuentan con toda su capacidad funcional y que en los tejidos periféricos la desarrollan por completo¹⁷⁶. Considerando esto, buscamos a la población ILC CD123^+ en un tejido periférico como la piel, donde se ha reportado la presencia de ILC. Interesantemente encontramos una población linfoide Lin^- con baja expresión de CD123 e intermedia de CD127, la cual pudiera ser la contraparte de la población caracterizada en sangre periférica. Esta población ILC $\text{CD123}^{\text{bajo}}$ expresa ROR γ t, IL-23R e interesantemente produce IL-17 e IL-22 tras su activación con PMA/ionomicina¹⁷⁵. Estos datos sugieren la existencia de una célula con características de ILC presente en sangre periférica y piel de sujetos sanos con la capacidad de producir citocinas implicadas en enfermedades inflamatorias crónicas.

III. JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

La psoriasis es una patología cutánea crónica multifactorial cuya etiología es desconocida. Los factores ambientales e inmunológicos son considerados como disparadores de la enfermedad. Entre los factores ambientales, las infecciones por *S. aureus* han sido asociadas con la enfermedad. En las lesiones psoriásicas existe una disbiosis en la microbiota, encontrándose una mayor frecuencia de *S. aureus* en comparación con individuos sanos. Además, la presencia de la Enterotoxina-B de *S. aureus* correlaciona positivamente con la severidad, sugiriendo su posible contribución a la patología.

Con respecto al sistema inmune, los linfocitos Th17 a través de la expresión de IL-17 son importantes en desarrollo y mantenimiento de las placas psoriásicas. Evidencias en modelos experimentales muestran que los linfocitos Th17 tienen dos fenotipos, el convencional y el patogénico, siendo este último capaz de exacerbar procesos inflamatorios crónicos. Además, se ha observado que las infecciones bacterianas pueden inducir el perfil patogénico en los linfocitos Th17. Sin embargo, en los pacientes con psoriasis se desconoce si las células Th17 tienen un fenotipo convencional o patogénico, y si el fenotipo patogénico puede ser inducido por estímulos asociados con la severidad como el SEB.

Otra población relevante en enfermedades inflamatorias crónicas son las células linfoides innatas (ILC). Nuestro grupo de trabajo describió en piel sana una población con características de ILC (ILC CD123^{bajo}) que expresa ROR γ t, IL-23R y es productora IL-17 e IL-22. Sin embargo, se desconoce si esta población podría estar presente en los pacientes con psoriasis y si contribuye en la fisiopatología a través de la producción de IL-17.

Conocer las características fenotípicas y funcionales de las poblaciones productoras de IL-17 sería de gran relevancia para el entendimiento de la patología. Además podría ser relevante considerando que los tratamientos de última generación en pacientes con psoriasis están dirigidos al bloqueo de esta citocina.

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Las características fenotípicas y funcionales patogénicas de los linfocitos Th17 serán inducidas por la enterotoxina B de *S. aureus* y la población ILC CD123^{bajo} producirá IL-17 en piel de pacientes con psoriasis.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las características fenotípicas y funcionales patogénicas de los linfocitos Th17 en presencia de la Enterotoxina B de *S. aureus* así como evaluar si la población ILC CD123^{bajo} produce IL-17 en piel de pacientes con psoriasis.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar a las células Th17 en dermis lesionada y sin lesión.
- Evaluar la expresión factores de transcripción en células Th17 después de la estimulación con la Enterotoxina B de *S. aureus*.
- Analizar el fenotipo convencional y patogénico en las células Th17 de dermis lesionada y sin lesión después del tratamiento con Enterotoxina B de *S. aureus*.
- Evaluar la producción de citocinas en los linfocitos Th17 de dermis lesionada tras la estimulación con Enterotoxina B de *S. aureus*.
- Determinar las características de plasticidad en linfocitos Th17 totales de sangre periférica y purificados.
- Identificar a la población ILC CD123^{bajo} en dermis lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis.
- Evaluar la capacidad de producción de citocinas en la población ILC CD123^{bajo} en dermis lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Reclutamiento y criterios de inclusión y exclusión de pacientes con psoriasis

Se reclutaron 67 pacientes con diagnóstico de psoriasis vulgar que acudieron al servicio de Dermatología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, al centro Dermatológico “Ladislao de la Pascua” y al Hospital General de Zona 1A “Venados” los cuales cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

De inclusión

1. Pacientes de 18 a 80 años de edad con cualquier estado socioeconómico.
2. Pacientes con diagnóstico clínico de psoriasis en placas con PASI leve (menor a 10), y grave (mayor a 10).
3. Pacientes que no hayan utilizado tratamiento tópico en los últimos 15 días previos al estudio o tratamiento sistémico en los últimos 2 meses.
4. Pacientes que mediante el consentimiento informado expresen de manera voluntaria su deseo de participar en el estudio.

De exclusión

1. Psoriasis clasificada en otras formas clínicas.
2. Pacientes que por ocupación o lugar de residencia no puedan acudir a control periódico.
3. Pacientes embarazadas o en periodo de lactancia.
4. Pacientes con alguna enfermedad autoinmune concomitante incluyendo artropatía psoriásica.
5. Pacientes en quienes exista la duda diagnóstica entre psoriasis y otra dermatosis.

Este trabajo se desarrolló cumpliendo con los lineamientos de la Declaración de Helsinki y, fue aprobado los comités de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social (R-2017-785-058) y del Centro Dermatológico “Ladislao de la Pascua”.

Muestras sangre venosa y biopsias de piel

Se obtuvieron 15 mL de sangre venosa de pacientes con psoriasis y se colectaron en tubos vacutainer con EDTA, mientras que la sangre control fue obtenida de concentrados leucocitarios de donadores sanos provenientes del banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Las biopsias de piel lesionada y sin lesión fueron obtenidas con un sacabocado de 6mm de diámetro, con una distancia entre ellas de al menos 2 centímetros. La piel sana se obtuvo a partir de remanentes de cirugías estéticas sin padecimientos dermatológicos o autoinmunes.

Anticuerpos utilizados para la identificación de linfocitos Th17 convencionales, patogénicos y de la población ILC CD123^{bajo}

Para identificación de linfocitos Th17 convencionales y patogénicos se realizó el marcaje extracelular con una incubación de 20 minutos a 4°C con el anticuerpo anti-CD3 PE. Posteriormente se realizó la fijación/permeabilización de las células colocando 100 microlitros del buffer de fijación diluido (True nuclear factor, eBioscience, 1:4) e incubando durante 20 minutos a 4°C. Después, las células se permeabilizaron con 100 microlitros del buffer de permeabilización diluido (Permeabilization buffer, eBioscience, 1:10) por 30 minutos. Posteriormente se añadieron al buffer de permeabilización los anticuerpos anti-CD4 APCy7, anti-ROR γ t APC, anti-T-bet PECy5, anti-Runx1 PE y anti-AhR PE para la determinar el fenotipo convencional y patogénico. Para la identificación de la población ILC CD123^{bajo} se utilizó un coctel de anticuerpos linaje anti CD3, CD14, CD19, CD94 y HLA-DR marcados con PE, anti-CD123 acoplado a PECy5 y anti-CD127 conjugado con BV410, los cuales se utilizaron para realizar el marcaje extracelular incubándose durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron 2 lavados con buffer de FACS y se resuspendieron en 200 microlitros de solución salina de fosfatos (PBS). Para la detección de citocinas intracelulares en células Th17 e ILC se incubaron las células con anti-IL17 FITC, anti-IL-22 APC y anti-IFN- γ PECy7 en presencia de buffer de permeabilización durante 30 minutos.

Obtención de células mononucleares de sangre periférica

La sangre se diluyó 1:2 con PBS y se colocó en un tubo falcon con lymphoprep (Axis-shield, relación 1:4 con la sangre). Posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 2000 rpm (720G), se recuperó el anillo correspondiente a las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y se lavaron dos veces (1500 rpm, 10 minutos) con 10mL de PBS. Después se realizó el conteo de las células mononucleares utilizando una cámara de Neubauer y se usó azul tripano para evaluar la viabilidad celular.

Cultivo primario de piel y obtención de células dermales

Las biopsias de piel se colocaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Biowest) suplementado con suero fetal bovino (10%, Biowest), HEPES (Biowest), aminoácidos no esenciales (Gibco), glutamina (Gibco), penicilina/estreptomicina (Biowest), ciprofloxacino (Altana), beta-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), se añadió dispasa grado II (Roche, 1mg/mL) y se incubó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se separó mecánicamente la epidermis de la dermis y esta última se colocó en placas de 6 pozos con medio RPMI 1640 suplementado y se incubó durante 5 días a 37°C y 5%CO₂. Transcurrido el tiempo, se recolectaron las células que migraron hacia el medio de cultivo y se contaron con una cámara de Neubauer, evaluando la viabilidad con azul tripano.

Aislamiento de células Th17 de sangre periférica

Los linfocitos Th17 fueron aislados de CMSP obtenidas de 2 pacientes con psoriasis. Posteriormente se incubaron con perlas magnéticas anti-CD4 (Miltenyi-Biotec) durante 15 minutos a 4°C. Después de un lavado con 500 µL de buffer de MACS (albumina sérica bovina 0.2%, EDTA 2mM, pH7.2), las células se pasaron a través de la columna magnética LS (Miltenyi-Biotec), se realizaron 3 lavados con 500µL de buffer MACS y posteriormente fueron removidas de la columna con 1mL de buffer de MACS. Una vez obtenidos los linfocitos T CD4⁺, fueron teñidos con los anticuerpos para los marcadores CD4 y CD161 durante 15 minutos a 4°C. Después

de realizar 1 lavado con PBS, los linfocitos Th17 (CD4⁺ CD161⁺) fueron aislados utilizando un citómetro de flujo FACS Aria II upgrade, con una pureza del 99%.

Activación y proliferación de linfocitos Th17 aislados de sangre periférica

Un mínimo de 30,000 linfocitos Th17 aislados fueron incubados con CellTrace Violet (ThermoFisher) durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente fueron lavados dos veces con PBS y colocados en placas de 96 pozos de fondo "V", las cuales fueron estimulados con anti-CD3 (1µg/mL, OKT3, ATCC) y anti-CD28 (6µg/mL, GeneTex) en presencia de IL-1β e IL-23 (50ng/mL, Peprotech) durante 72 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo se cosecharon las células y se les realizó una tinción de marcadores de superficie e intracelulares para determinar su fenotipo, proliferación y la producción de citocinas mediante citometría de flujo.

Activación de células dermales

Para el análisis de las células ILC CD123^{bajo}, se utilizaron 1x10⁵ células de dermis como mínimo y se colocaron en placas de 96 pozos, las cuales fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ durante 18 horas con IL-1β (50ng/mL), IL-2 (30ng/mL) e IL-23 (50ng/mL) (PeproTech). Transcurridas 12 horas se añadió PMA-Ionomicina (2µL/mL, eBioscience). Para la detección de citocinas intracelulares se añadió un coctel que contiene brefeldina/monensina (2µL/mL, eBioscience) 6 horas antes del termino de la incubación. Para el análisis de citocinas intracelulares en linfocitos Th17 se emplearon 5x10⁴ células dermales como mínimo, las cuales fueron incubadas con la enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (1µg/mL, Sigma Aldrich) a 37°C y 5% CO₂ durante 5 días. Para la detección de citocinas intracelulares en las ultimas 6 horas de incubación se añadió brefeldina/monensina (2µL/mL, eBioscience) para la inhibición del transporte de proteínas.

Proliferación de linfocitos Th17

Se utilizaron 5x10⁴ células dermales o CMSP, las cuales fueron incubadas con carboxifluoresceína succinimidil éster durante 10 minutos. Después se añadió 1mL

de suero fetal bovino, se lavaron dos veces con PBS-albumina sérica bovina (1500 rpm, 400G, 10 minutos) y se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado. Las células se estimularon con SEB (1µg/mL) y se incubaron durante 5 días a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente las células fueron recuperadas y teñidas para marcadores extra e intracelulares y se realizó la identificación de los linfocitos Th17 proliferantes mediante citometría de flujo.

Cuantificación de citocinas mediante arreglos de perlas citometricas

La cuantificación se realizó utilizando el multiplex de citocinas Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg (ThermoFisher, catalogo No. EPX180-12165-901). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se utilizaron 50µL obtenidos de sobrenadantes de células dermales de pacientes activadas con SEB. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACS Aria, los datos se analizaron usando el software Flowjo y la cantidad de citocina se calculó usando Microsoft Excel.

Citometría de flujo

Las CMSP o las células dermales fueron incubadas con buffer de bloqueo (Suero de caballo al 2%, azida de sodio 0.5mM y EDTA al 0.05%) durante 20 minutos. Posteriormente las células fueron incubadas con los anticuerpos que detectan las moléculas extracelulares durante 20 minutos a 4°C y transcurrido el tiempo se realizaron dos lavados con PBS (1500 rpm, 400G, tres minutos). Para la determinación de citocinas intracelulares se incubaron con 200µL el buffer de fijación/permeabilización durante 20 minutos a 4°C. Después se añadieron los anticuerpos contra las moléculas intracelulares y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las células fueron lavadas 2 veces con PBS (1500 rpm, 400G, tres minutos), se resuspendieron en 200 µL de buffer de bloqueo para ser adquiridas en un citómetro de flujo FACS Canto y analizadas con el software FlowJo 8.4.

Inmunofluorescencia múltiple de biopsias de piel

Las biopsias de piel se incluyeron en O.C.T compound (Sakura Finetek Europe), se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . Posteriormente secciones de $15\ \mu\text{m}$ fueron cortadas con un criostato (Leica CM3050, Leica Biosystems) y colocadas en portaobjetos cargados positivamente con poli-L-lisina. El tejido se fijó con para-formaldehído al 4% y se recuperaron los antígenos usando buffer de citratos pH 6 (Tri-citrato de sodio dihidratado 3%). Los tejidos se trataron con buffer de permeabilización (Albumina sérica bovina 10mg/mL, suero de caballo al 5%, azida de sodio 0.02% y tritón 0.5%) durante dos horas. Después se incubó con el anticuerpo primario anti-CD4 durante 18 horas y con el anticuerpo secundario acoplado a FITC durante dos horas. Para la identificación de células Th17 se incubó el anti-ROR γ t PE durante dos horas. Para la detección de citocinas *in situ* se incubaron las laminillas con los anticuerpos primarios anti-CD4, anti-IL-17 y anti-IFN- γ durante 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron los anticuerpos secundarios anti-conejo FITC y anti-cabra Biotina y con estreptavidina rojo Texas y anti-ratón APC. Las laminillas fueron teñidas con Hoescht durante 10 minutos y montadas con Vectashield (Vector Laboratories). Finalmente se realizó la adquisición de las imágenes en microscopio confocal Nikon T1 Eclipse (Nikon Corporation) con el objetivo 20X. Se obtuvieron al menos tres diferentes campos por laminilla y las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software Image J.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa Prism 5 y los resultados se presentan como el promedio \pm la desviación estándar media. Para los datos no paramétricos se utilizó la prueba U de Mann Whitney, comparando los resultados de la dermis lesionada y sin lesión. Para comparar los grupos estimulados vs no estimulados se empleó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. El análisis del arreglo de perlas citométricas se utilizó la prueba t de student no pareada con corrección de Welch. La correlación de la severidad y la cantidad de citocinas fue calculada mediante la correlación de Spearman. Un valor de p menor a 0.05 fue considerado como significativo.

VI. RESULTADOS

RESULTADOS

Identificación de células Th17 en biopsias de pacientes con psoriasis

La identificación de células Th17 en diversas patologías humanas incluida la psoriasis ha sido realizada con base en la producción de citocinas como IL-17⁹³. Sin embargo, considerando que el factor de transcripción ROR γ t regula la diferenciación y función de células Th17¹⁷⁷ decidimos evaluar la presencia de linfocitos Th17 mediante la expresión de ROR γ t, adicional a su identificación mediante IL-17.

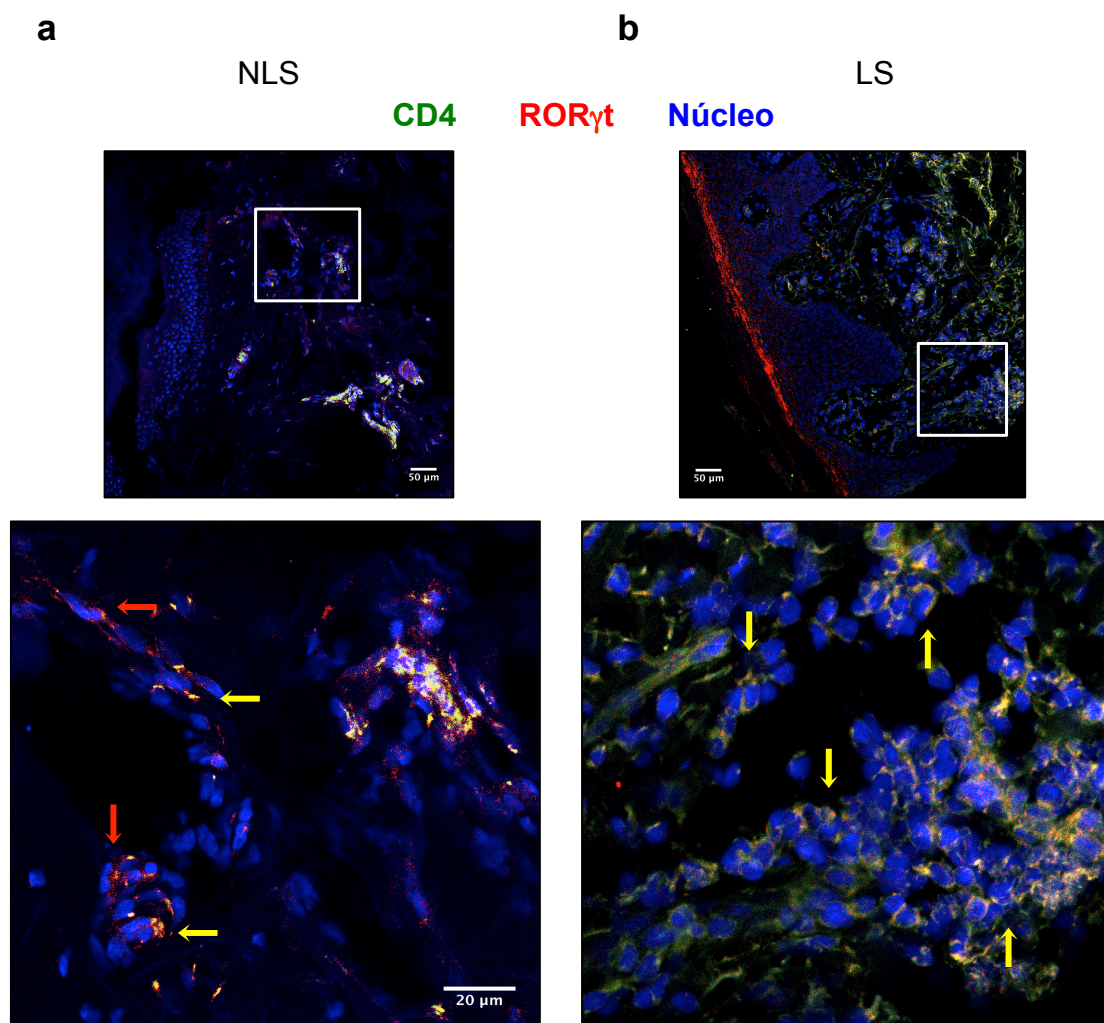


Figura 7. Identificación *in situ* de linfocitos Th17 (CD4⁺ ROR γ t⁺) en dermis lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis. Cortes histológicos de a) dermis sin lesión (NLS) y b) dermis lesionada (LS), mediante inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti-CD4 (verde), anti-ROR γ t (rojo) y los núcleos teñidos con Hoescht (azul). Las imágenes superiores corresponden al campo total y las inferiores muestran la región ampliada (cuadro blanco). Células CD4⁺ ROR γ t⁺ (flechas amarillas) y células CD4⁻ ROR γ t⁺ (flechas rojas). Imágenes representativas de tres pacientes. 20X.

Mediante microscopía confocal encontramos que la dermis no lesionada (NLS) contiene pocas células $CD4^+ ROR\gamma t^+$ y $CD4^+ IL-17^+$ mientras que en la dermis lesionada (LS) del mismo paciente se observa una tendencia en el incremento (Figuras 7, 8 y 9) de células $CD4^+ ROR\gamma t^+$ así como de células $CD4^+ IL-17^+$ (Figura 7 y 8, flechas amarillas). Estos resultados muestran que hay linfocitos Th17 en la dermis de pacientes con psoriasis.

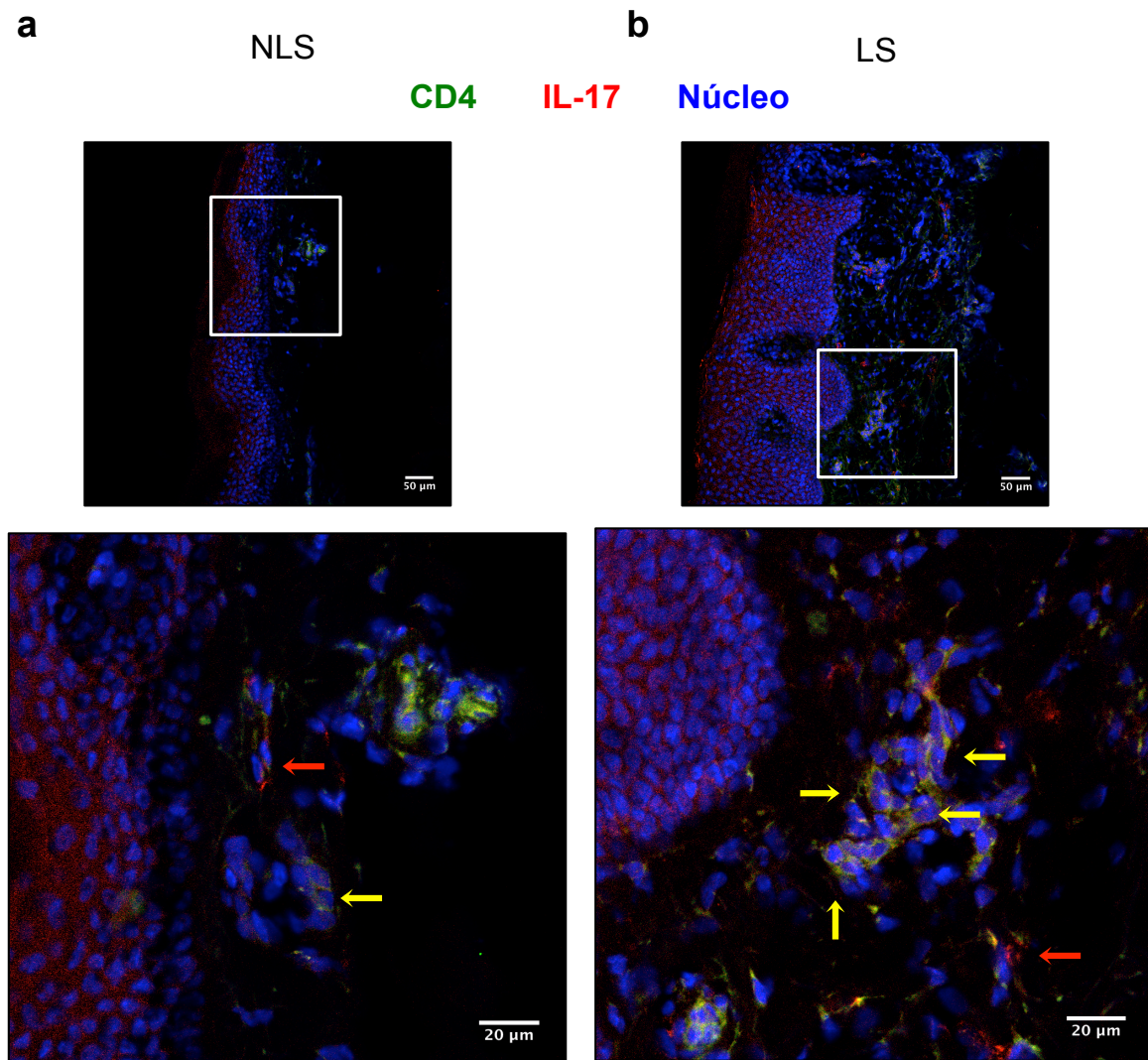


Figura 8. Identificación *in situ* de IL-17 en dermis lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis. Células productoras de IL-17 en cortes histológicos de **a)** dermis sin lesión (NLS) y **b)** dermis lesionada (LS), mediante inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti-CD4 (verde), anti-IL-17 (rojo) y los núcleos teñidos con Hoescht (azul). Las imágenes superiores muestran el campo total y las inferiores la región ampliada (cuadro blanco). Células $CD4^+ IL-17^+$ (flechas amarillas) y células $CD4^- IL-17^+$ (flechas rojas). Imágenes representativas de tres pacientes. 20X.

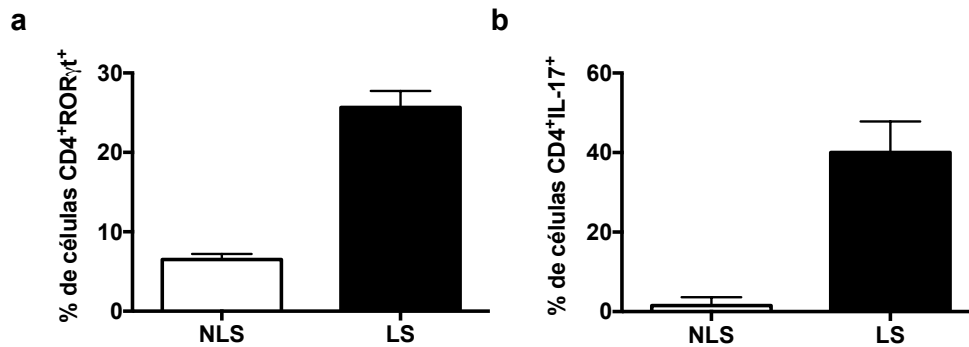


Figura 9. Porcentaje de células *in situ* CD4⁺ RORγt⁺ y CD4⁺ IL-17⁺ en dermis lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis. Las graficas muestran los porcentajes de células a) CD4⁺ RORγt⁺ y b) CD4⁺ IL-17⁺ presentes en cortes histológicos de dermis no lesionada (NLS) y dermis lesionada (LS). Se contaron 100 células en al menos dos diferentes campos de las muestras. NLS n=3, LS n=3. U de Mann Whitney.

Posteriormente determinamos mediante citometría de flujo la presencia de células Th17 utilizando RORγt para identificarlas. Las células dermales fueron analizadas excluyendo agregados celulares, tomando la región de tamaño y complejidad correspondiente a los linfocitos y descartando las células no viables. Los linfocitos positivos para CD3 y los que expresaran CD4 y RORγt se consideraron como linfocitos Th17 (Figura 10a). Encontramos que los porcentajes de las células T, CD4⁺ y Th17 son similares en la dermis sin lesión y la dermis lesionada de los pacientes (Figura 10b-10d). Considerando el porcentaje, el número de células obtenidas en el cultivo y el tamaño de la biopsia se realizó el cálculo de los números absolutos de linfocitos T, T CD4⁺ y Th17. Al analizar estos datos encontramos un incremento significativo de células T, células CD4 y de manera interesante las células Th17 presentes en dermis LS en comparación con dermis NLS (Figura 10e-10g). En conjunto, estos resultados muestran que los linfocitos Th17 están incrementadas en la dermis LS en comparación con la dermis NLS, lo cual concuerda con la literatura previa⁹⁷.

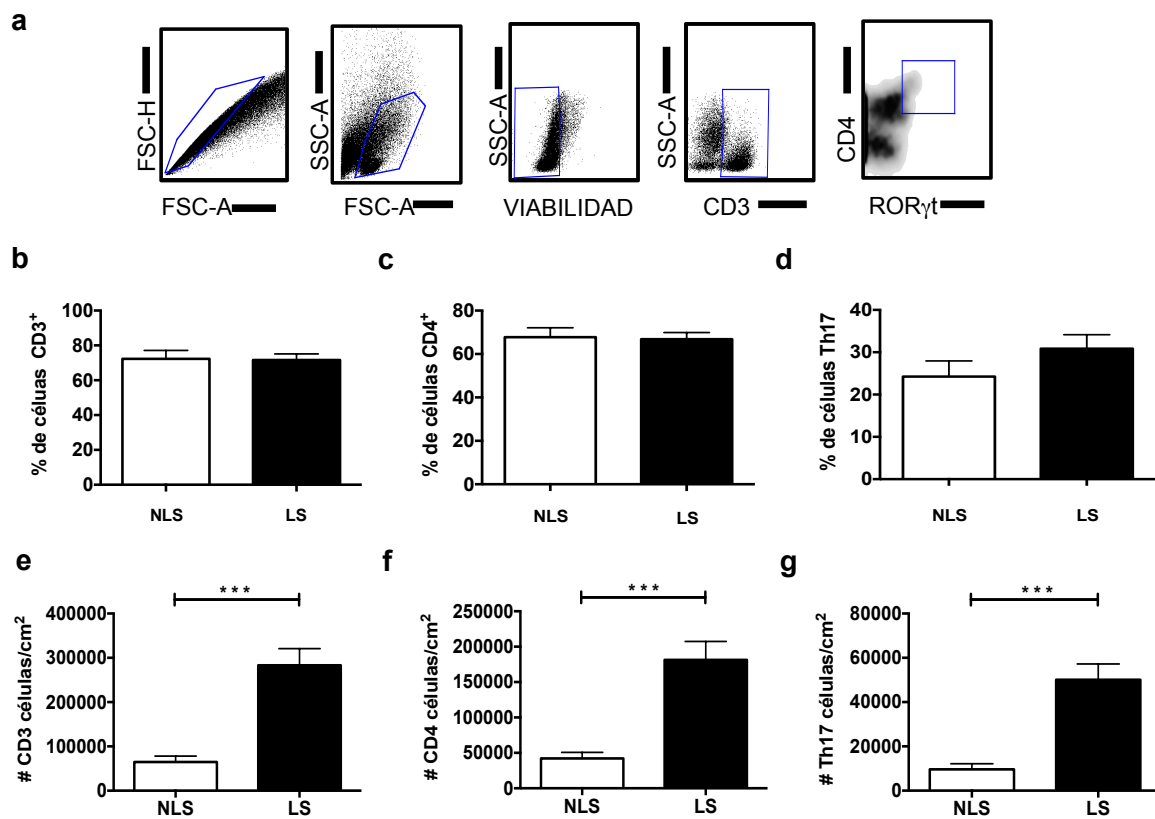


Figura 10. Los linfocitos Th17 se encuentran en dermis lesionada y sin lesión de pacientes con psoriasis. a) estrategia de análisis. Porcentajes de **b)** células CD3⁺, **c)** células CD4⁺ y **d)** células Th17. Se muestran los números absolutos de **e)** células CD3⁺, **f)** células CD4⁺ y **g)** células Th17 por centímetro cuadrado de piel. Dermis no lesionada (NLS, n=23), dermis lesionada (LS, n=38). ***p<0.001. U de Mann Whitney.

La estimulación con SEB induce el fenotipo patogénico en células Th17 presentes en dermis de pacientes con psoriasis

En modelos de ratón con inflamación crónica se ha demostrado que las células Th17 pueden co-expresar factores de transcripción maestros de células Th1 como T-bet. Con lo cual, se ha propuesto la existencia de dos sub-poblaciones de linfocitos Th17 de acuerdo a la expresión de los factores de transcripción ROR γ t, T-bet y Runx1¹²³. Sin embargo, en los pacientes con psoriasis se desconoce cuál es el fenotipo de las células Th17 y si un estímulo asociado con la severidad como es la Enterotoxina-B de *S. aureus* pudiera impactar en el fenotipo de estas células.

Como se observa en la Figura 11 en dermis LS y NLS encontramos que las células Th17 incrementan significativamente la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y T-bet después de la estimulación con SEB. Mientras que la expresión de Runx1 solo se incrementa en los linfocitos Th17 provenientes de la dermis LS. Estos resultados muestran que las células Th17 adquieren un fenotipo patogénico en respuesta al SEB, principalmente en la dermis LS.

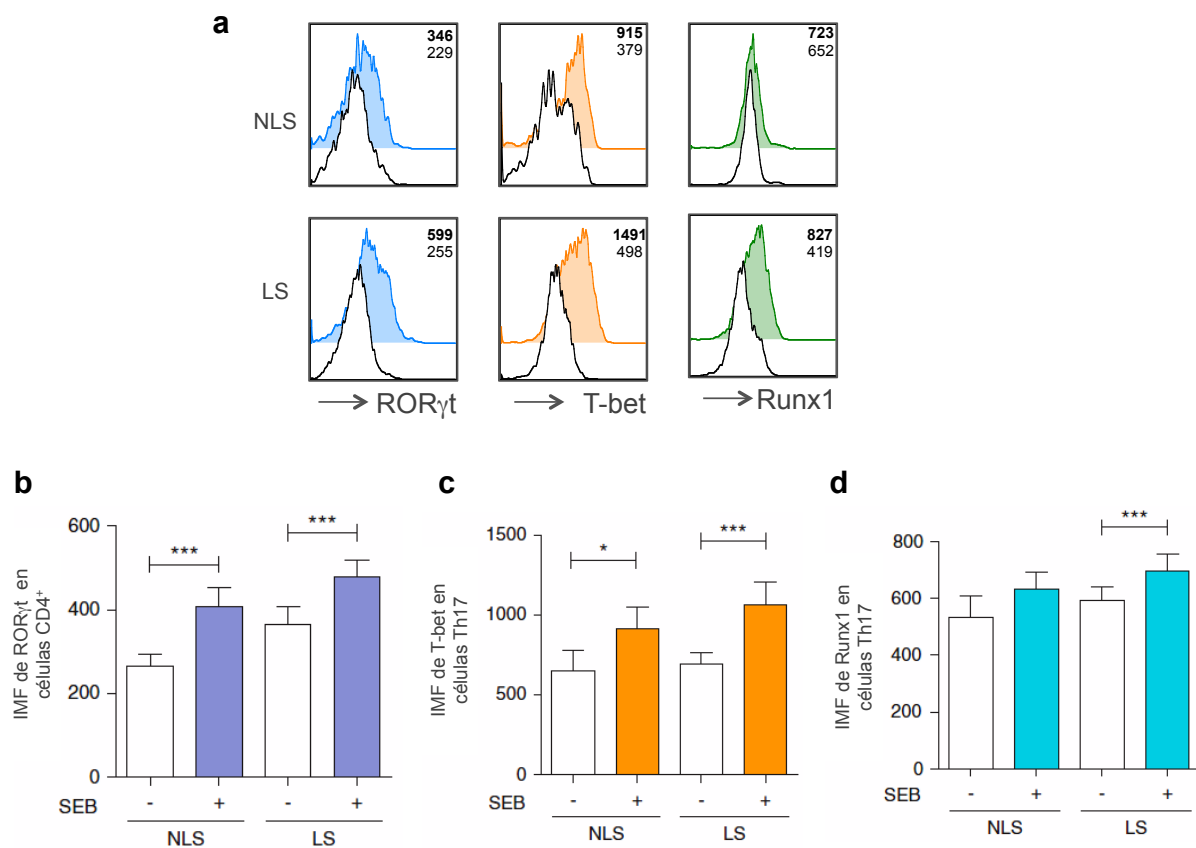


Figura 11. La estimulación con SEB incrementa la expresión de ROR γ t, T-bet y Runx1 en linfocitos Th17 de dermis NLS y LS. a) histogramas representativos de la expresión de ROR γ t, T-bet y Runx1 en células Th17 antes (histograma vacío) y después de la estimulación (histograma lleno). Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión de **b)** ROR γ t en células CD4⁺, **c)** T-bet y **d)** Runx1 en linfocitos Th17 en presencia o ausencia de Enterotoxina B de *S. aureus* (SEB, 1 μ g/mL). Dermis no lesionada (NLS, n=23); dermis lesionada (LS, n=38). * p <0.05, *** p <0.001. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

Considerando que el SEB modificó la expresión de los factores de transcripción, evaluamos la frecuencia de los linfocitos Th17 con fenotipo convencional ($ROR\gamma_t^+$, $Runx1^{+/-}$, $T-bet^-$) o patogénico ($ROR\gamma_t^+$, $Runx1^{+/-}$, $T-bet^+$). En la figura 12a se observa que en ambos sitios hay linfocitos Th17 con fenotipo convencional y patogénico. Sin embargo, encontramos que la activación con SEB disminuye el porcentaje de células Th17 convencionales e incrementa el porcentaje de las patogénicas en la dermis LS de los pacientes (Figura 12b-12c). Este dato se confirmó al calcular el índice de células Th17 convencionales versus patogénicas, el cual se incrementa después del tratamiento con SEB (Figura 12d). Estos resultados muestran que el SEB es capaz de modificar la expresión de los factores de transcripción que determinan el fenotipo de las células Th17 e impactar en las frecuencias de estas poblaciones.

En modelos de encefalomiелitis autoinmune experimental o colitis se ha demostrado que la transferencia de células Th17 patogénicas induce una mayor severidad de la enfermedad¹⁰⁵. Debido a que encontramos células con fenotipo patogénico, el cual se acentúa después del tratamiento con SEB, nos preguntamos si las células Th17 patogénicas pudieran tener una relación con la severidad de la enfermedad. Uno de los parámetros clínicos que determinan la severidad es el área corporal afectada, proponiéndose que a mayor área afectada, mayor severidad. Por lo tanto evaluamos la frecuencia de células Th17 convencionales y patogénicas en 38 pacientes con placas pequeñas y placas grandes. Interesantemente encontramos que solo los pacientes con placas grandes incrementan de manera significativa el porcentaje de linfocitos Th17 patogénicos después de la estimulación con SEB (Figura 12e). Estos resultados nos sugieren que la presencia de células Th17 patogénicas podría estar asociada a la generación de placas grandes en estos pacientes.

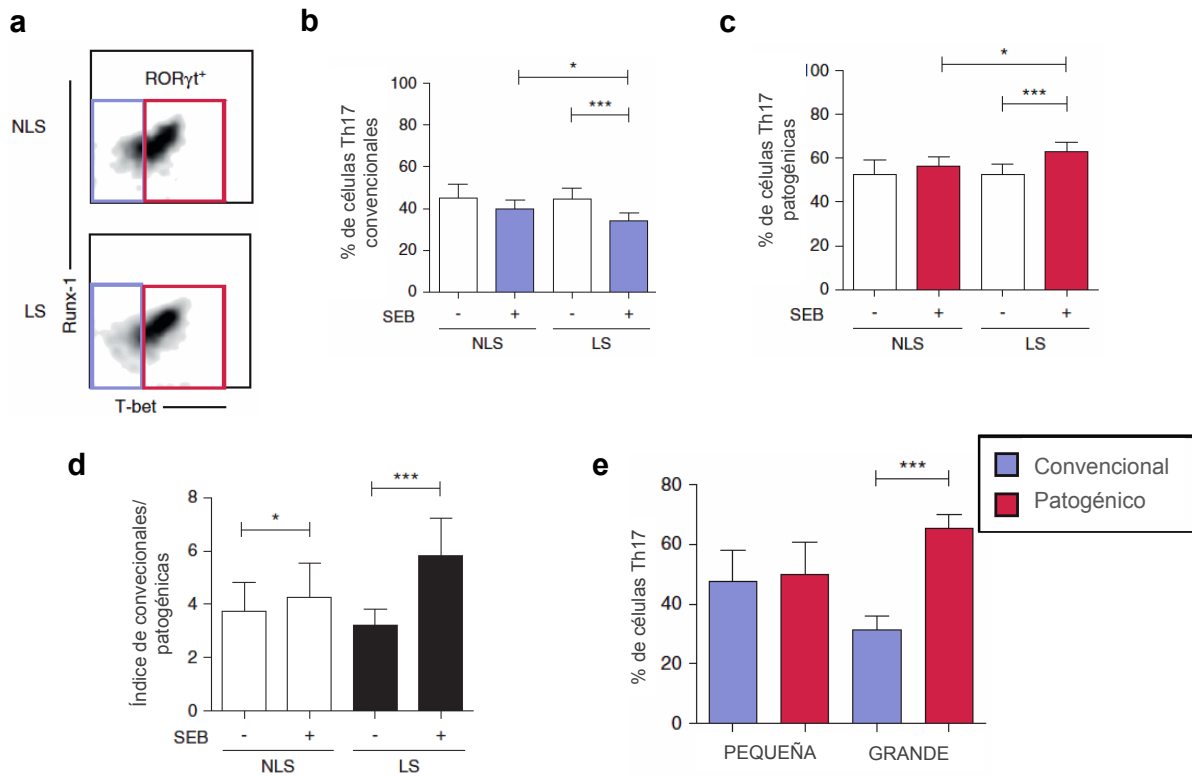


Figura 12. La estimulación con SEB induce el incremento de linfocitos Th17 con fenotipo patogénico. a) Células Th17 (CD4⁺ ROR γ t⁺) convencionales (cuadro azul) y patogénicas (cuadro rojo). Porcentaje de linfocitos Th17 con fenotipo **b)** Convencional y **c)** Patogénico presentes en dermis NLS y LS tratados con o sin SEB. **d)** Índice de linfocitos Th17 convencionales y patogénicos. **e)** Porcentaje de linfocitos Th17 convencionales y patogénicos presentes en lesiones psoriásicas pequeñas y grandes. NLS, n=23; LS n=38.*p<0.05, ***p<0.001. U de Mann Whitney, Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

Presencia *in situ* de células Th17 patogénicas

Los linfocitos Th17 convencionales y patogénicos pueden ser identificados por las citocinas que producen. Las células Th17 convencionales se caracterizan por expresar IL-17 mientras que las patogénicas pueden producir IL-17 e IFN- γ simultáneamente¹²⁴. Es por ello que buscamos *in situ* la presencia de células T CD4 con fenotipo funcional convencional o patogénico. De acuerdo con la Figura 13, la dermis LS contiene un gran infiltrado de células CD4⁺ que producen IL-17 (flechas amarillas) pero de manera interesante encontramos células que son capaces de co-expresar IL-17 e IFN- γ (flechas blancas). En contraste, la dermis NLS del mismo paciente hay muy pocas células T CD4⁺ productoras de IL-17. Al hacer la cuantificación de las células IL-17⁺ IFN- γ ⁺ observamos una tendencia en el

incremento de estas células de la dermis LS en comparación con la dermis NLS (figura 13c). Estos datos sugieren que en la piel lesionada de los pacientes hay células Th17 con fenotipo funcional patogénico.

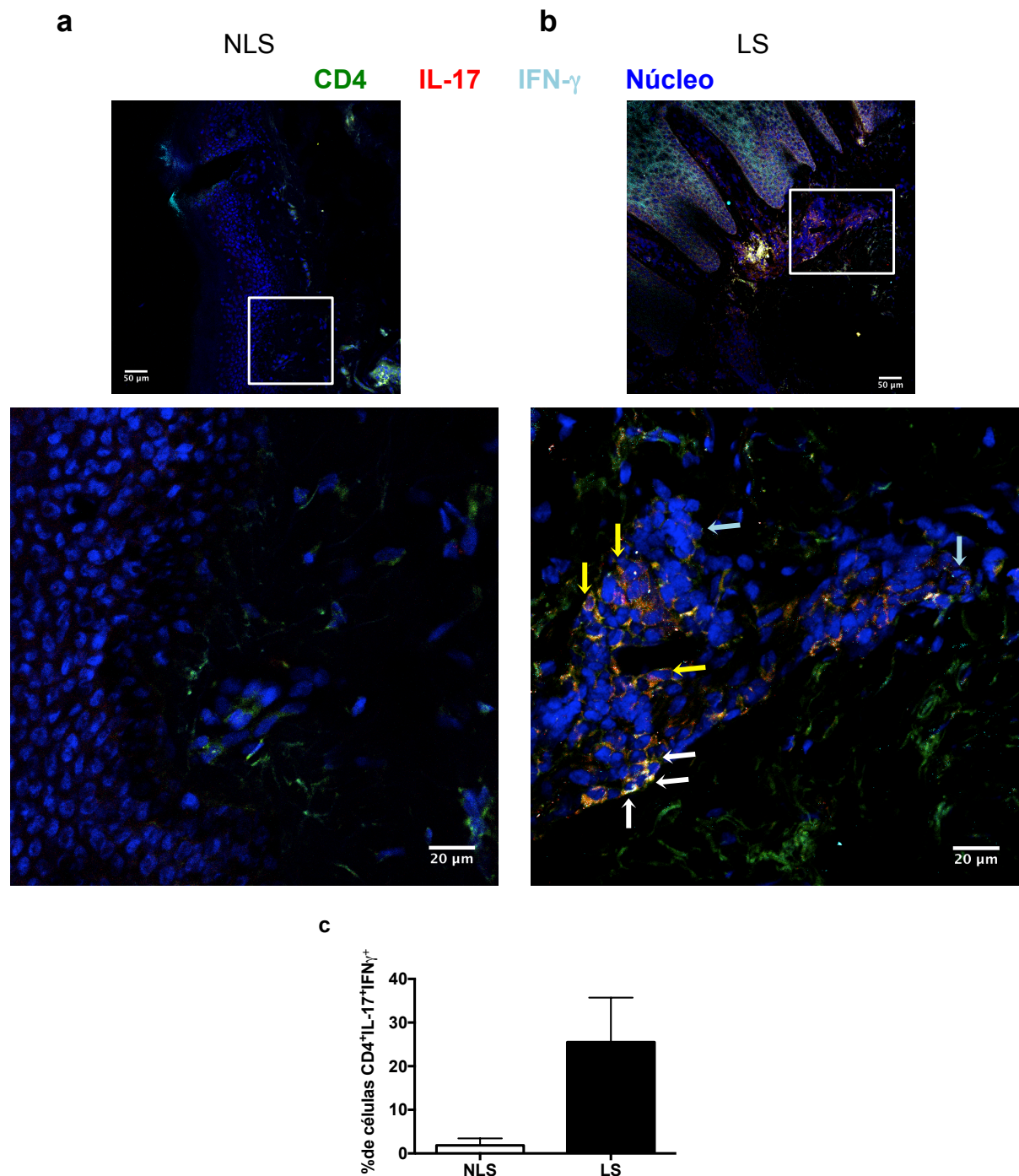


Figura 13. Presencia *in situ* de linfocitos Th17 con fenotipo funcional patogénico. Inmunofluorescencia de **a)** dermis no lesionada (NLS) y **b)** dermis lesionada (LS), con anti-CD4 (verde), anti-IL-17 (rojo), anti-IFN- γ (cyan) y los núcleos con Hoescht (azul). Las imágenes superiores muestran el campo total y las inferiores la región ampliada (cuadro blanco). Células CD4⁺ IL-17⁺ (flechas amarillas), células CD4⁺ IFN- γ ⁺ (flechas azules) y células CD4⁺ IL-17⁺ IFN- γ ⁺ (flechas blancas). **c)** Porcentaje de células CD4⁺ IL-17⁺ IFN- γ ⁺ presentes en dermis NLS (n=3), LS (n=3). U de Mann Whitney.

La estimulación con SEB induce características funcionales patogénicas en células Th17 presentes en la dermis lesionada

Considerando que la estimulación con SEB cambio el fenotipo de las células Th17, decidimos evaluar si el SEB podría tener un efecto en su capacidad funcional. Para ello, una vez obtenida la suspensión de células dermales de piel lesionada y sin lesión, realizamos una activación con PMA/ionomicina (el cual es utilizado para analizar la producción de citocinas en células T CD4⁺ en psoriasis) o con SEB y evaluamos la producción de IL-17 e IFN- γ en células Th17 (CD4⁺ ROR γ t⁺).

En la Figura 14a se observa que después de la estimulación con PMA/ionomicina hay células Th17 convencionales (IL-17⁺) y pocas células Th17 patogénicas dobles positivas o IFN- γ ⁺. Sin embargo, la estimulación con SEB induce la presencia de células dobles productoras y en mayor medida de células Th17 de IFN- γ ⁺. Al analizar 10 pacientes encontramos que la estimulación con PMA/ionomicina induce la expresión de IL-17 e IFN- γ mientras que el SEB induce de manera significativa la producción de IFN- γ (Figura 14b-14c). Estos resultados muestra que el SEB favorece un fenotipo funcional patogénico en las células Th17 presentes en la dermis lesionada.

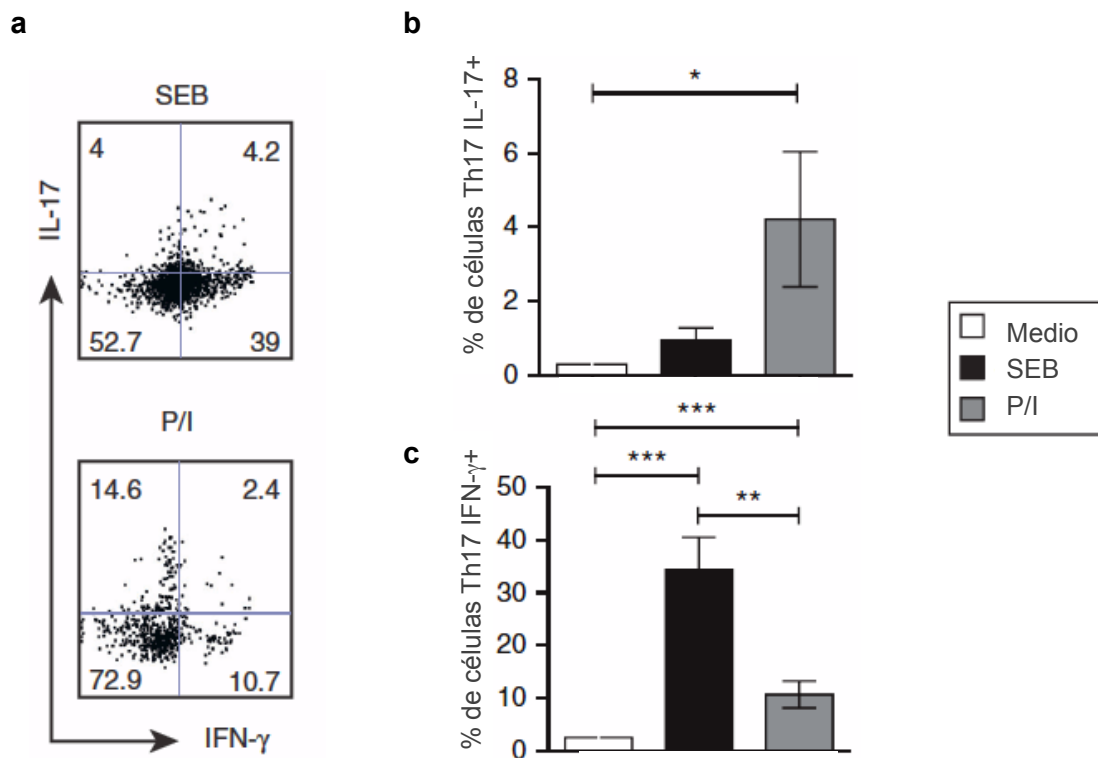


Figura 14. La estimulación con SEB induce un fenotipo funcional patogénico en linfocitos Th17 de dermis lesionada. a) Producción intracelular de IL-17 e IFN- γ en linfocitos Th17 en presencia de SEB o PMA/Ionomomicina (P/I). Porcentaje de células Th17productoras de b) IL-17⁺ e c) IFN- γ ⁺ presentes en dermis lesionada (LS) después del tratamiento con SEB o con P/I. n=10. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

Después de observar que el SEB favorece el perfil funcional patogénico en los linfocitos Th17 en dermis lesionada, quisimos evaluar si es un fenómeno exclusivo de las células presentes en dermis lesionada o si puede presentarse en piel sin lesión, piel sana o inclusive si ocurre en otra dermatosis crónica como la dermatitis atópica. Al activar las suspensiones celulares de estas biopsias encontramos que en hay un ligero incremento de ROR γ t, una escasa producción de IL-17 y menor producción de IFN- γ (Figura 15). En conjunto estos resultados muestran que la estimulación con SEB favorece el fenotipo funcional patogénico únicamente en la dermis lesionada de los pacientes con psoriasis.

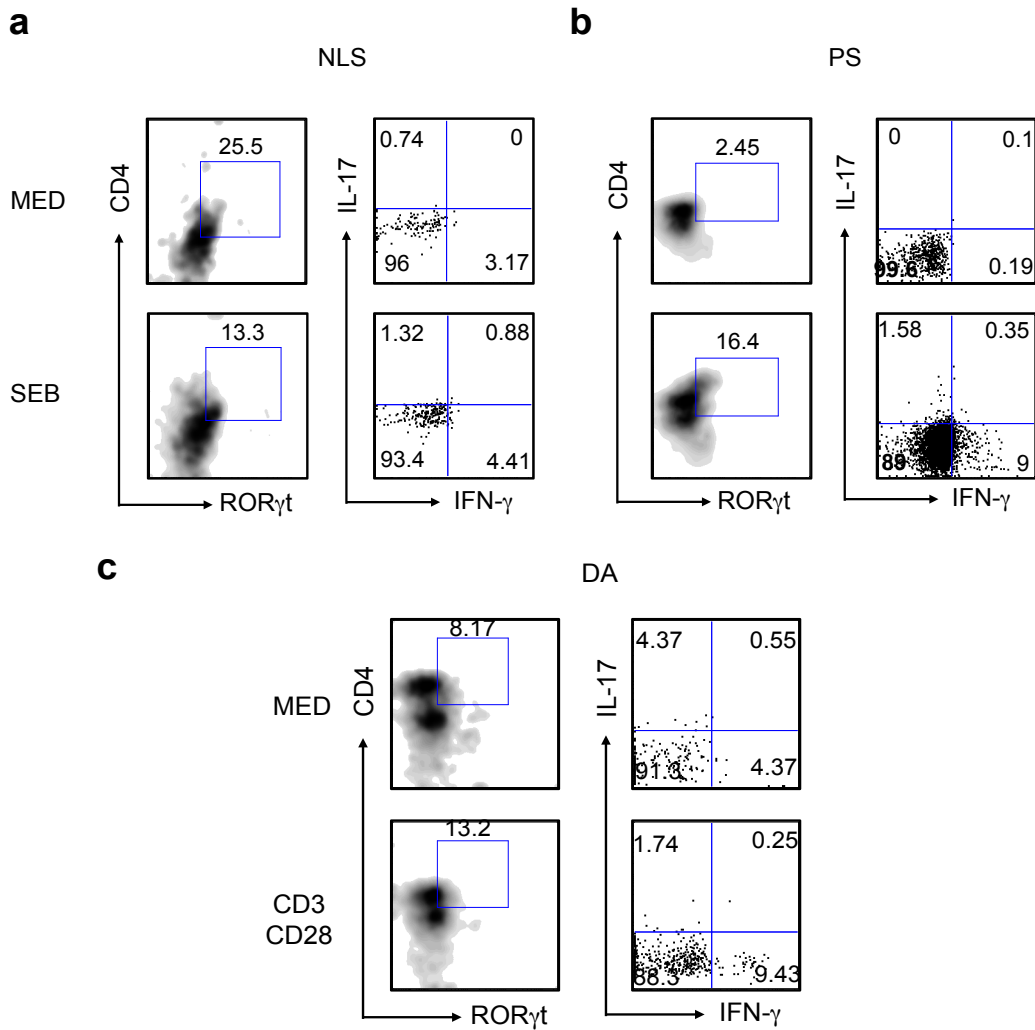


Figura 15. La estimulación con SEB no induce un fenotipo funcional patogénico en linfocitos Th17 de dermis sin lesión, dermis sana y en dermatitis atópica. Plots representativos de linfocitos Th17 ($CD4^+ ROR\gamma t^+$) y la producción intracelular de $IL-17^+$ e $IFN-\gamma^+$ en células obtenidas de **a**) dermis sin lesión (NLS), **b**) dermis sana (PS) y **c**) dermis de dermatitis atópica (DA). Los gráficos superiores de cada inciso muestran la condición sin estímulo y los inferiores los estimulados con SEB o con anti-CD3/CD28.

SEB induce un microambiente patogénico en dermis lesionada de pacientes con psoriasis

Los linfocitos Th17 convencionales y patogénicos difieren en el patrón de citocinas que producen, mientras que los convencionales se caracterizan por producir IL-17 e IL-9, los patogénicos preferentemente secretan $TNF-\alpha$, IL-22 e $IFN-\gamma$ ¹²³. Con lo anterior aunado a la asociación de SEB con la severidad de la psoriasis^{11,12} consideramos relevante evaluar el perfil de citocinas convencional o patogénico

después de la estimulación con SEB en los sobrenadantes de los cultivos de células dermales y si existe una relación con el PASI de la enfermedad.

La figura 16a muestra que después del tratamiento con SEB, la producción de IL-17 solo se incrementa en la dermis LS y es menor en aquellos pacientes con mayor severidad. De manera interesante encontramos que la producción de IFN- γ se incrementa después de la estimulación, independientemente de la severidad de la enfermedad (Figura 16b). En el caso de TNF- α , se observa un incremento en su producción después de tratamiento con SEB, aunque este incremento pareciera ser menor en los pacientes con mayor severidad (PASI>10, Figura 16c). Mientras que los niveles de IL-22 aumentan significativamente en la dermis LS en pacientes con bajo y alto PASI (Figura 16d)

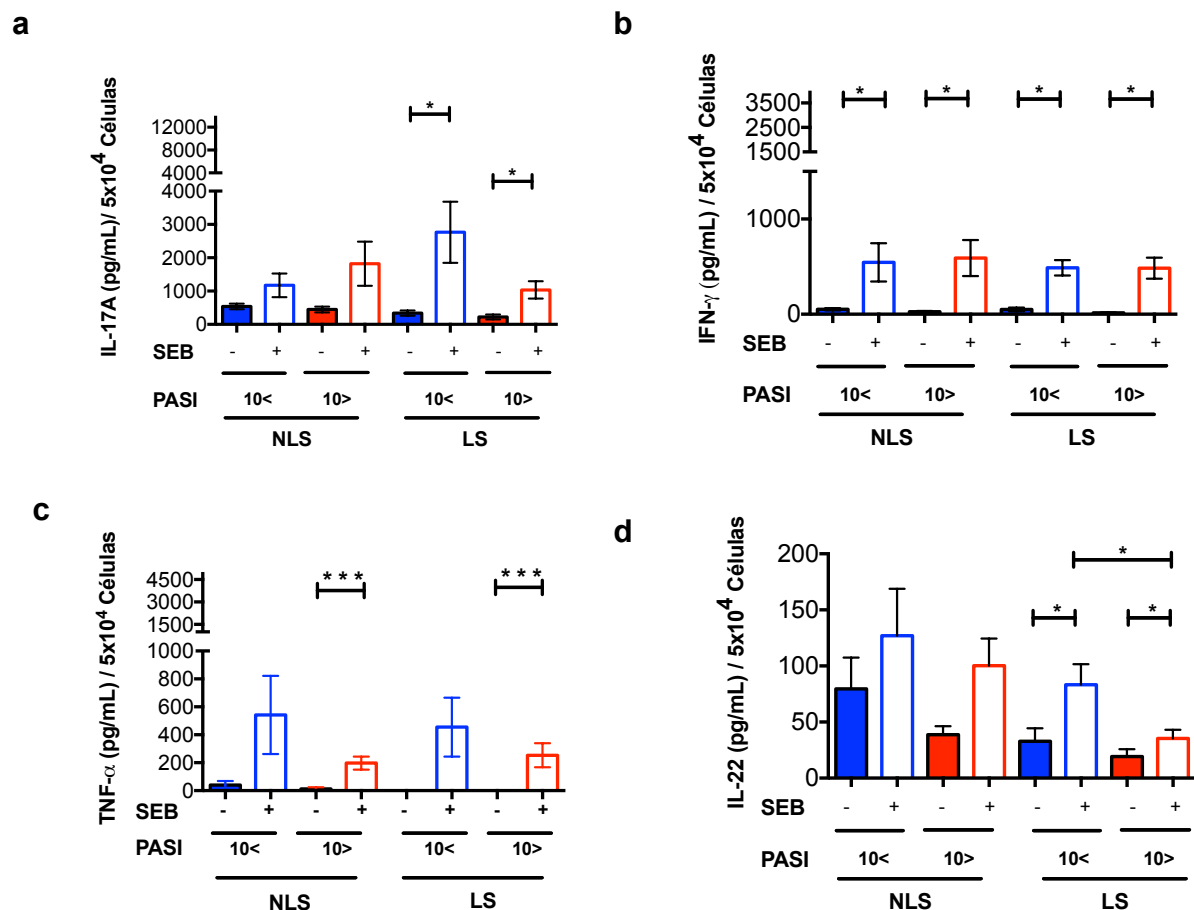


Figura 16. Inducción de un microambiente patogénico en dermis lesionada después de la estimulación con la Enterotoxina B de *S. aureus*. Concentración de a) IL-17A, b) IFN- γ , c) TNF- α y d) IL-22 en dermis no lesionada (NLS) y dermis lesionada (LS). Los resultados fueron analizados de acuerdo a la severidad de la enfermedad (PASI), menor 10 fue considerado bajo y mayor a 10 como severo. n=25 *p<0.05, ***p<0.001. Prueba de T no pareada con corrección de Welch.

Después de encontrar que la estimulación con SEB induce citocinas inflamatorias decidimos evaluar como se encontraban algunas citocinas asociadas a funciones reguladoras producidas por los linfocitos Th17, en específico la IL-9. Esta citocina cumple diversas funciones en el sistema inmunológico sin embargo, una de las más importantes es promover la función de las células T reguladoras¹⁷⁸. Nuestros resultados muestran un ligero incremento en la dermis LS de los pacientes con PASI bajo pero sorprendentemente ya no se encontró en pacientes con PASI alto aun con la estimulación (figura 17a). Al observar este ultimo dato, decidimos determinar si existía una correlación entre el PASI y la cantidad de IL-9 producida por la estimulación con SEB. Encontramos que hay una correlación negativa y significativa entre la severidad de la enfermedad y la producción de IL-9 (figura 17b). En conjunto estos resultados muestran que la estimulación con SEB induce un microambiente patogénico debido al incremento de IFN- γ , TNF- α e IL-22 y a la disminución de citocinas reguladoras como IL-9 en los pacientes con mayor severidad.

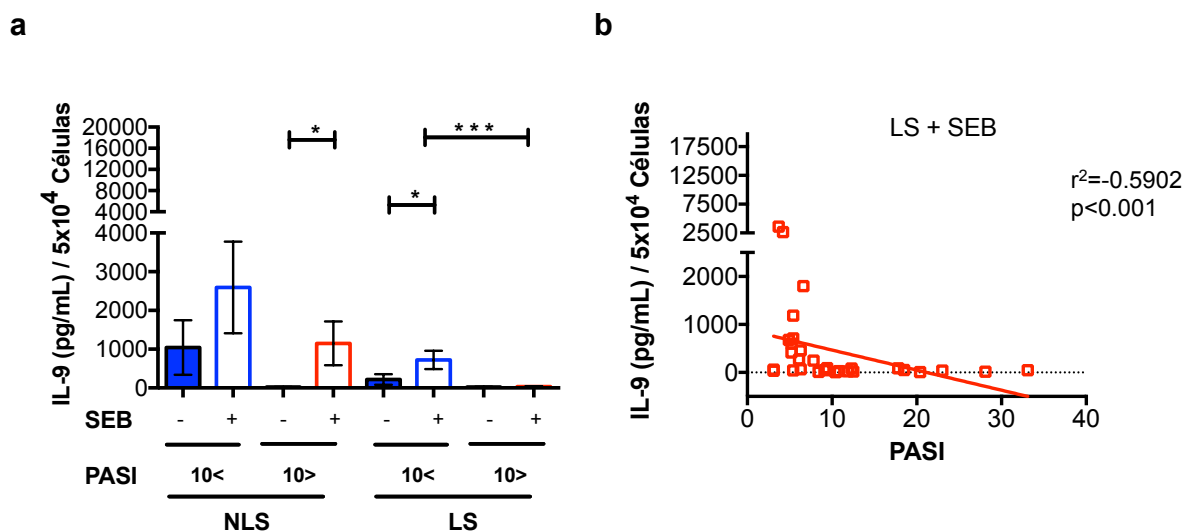


Figura 17. La presencia de IL-9 después de la activación con SEB correlaciona negativamente con la severidad de la psoriasis. Mediante arreglos de perlas citométricas se determinó la concentración de **a)** IL-9 en dermis no lesionada (NLS) y lesionada (LS), analizados de acuerdo al valor del PASI. **b)** Correlación entre el PASI y la concentración de IL-9 en el sobrenadante del cultivo estimulado con SEB en dermis LS. n=25 *p<0.05, ***p<0.001. Prueba de T no pareada con corrección de Welch. Correlación de Spearman.

La adquisición del fenotipo patogénico en respuesta al SEB ocurre en células Th17 de dermis lesionada y sangre periférica

Una vez que demostramos que el SEB induce características patogénicas en células Th17 residentes del tejido, nos preguntamos si el efecto del SEB está restringido a células residentes de tejido o si puede inducir características patogénicas en células Th17 de sangre periférica. Para ello estimulamos CMSP y células de dermis LS del mismo paciente con el superantígeno y evaluamos la proliferación celular así como la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y T-bet. En la figura 18 se aprecia que las células Th17 de dermis LS tienen una proliferación basal la cual se incrementa después de la estimulación, en contraste las células Th17 de sangre periférica parecen tener una proliferación más discreta después de la estimulación. En cuanto a los factores de transcripción, se observa que la de inducción de ROR γ t y T-bet es más evidente en linfocitos Th17 de piel aunque en las células de sangre periférica también se incrementa esta expresión. Estos resultados podrían indicar que la plasticidad de los linfocitos Th17 ocurre tanto en sangre como en dermis LS, siendo mas evidente en la células provenientes de la lesión.

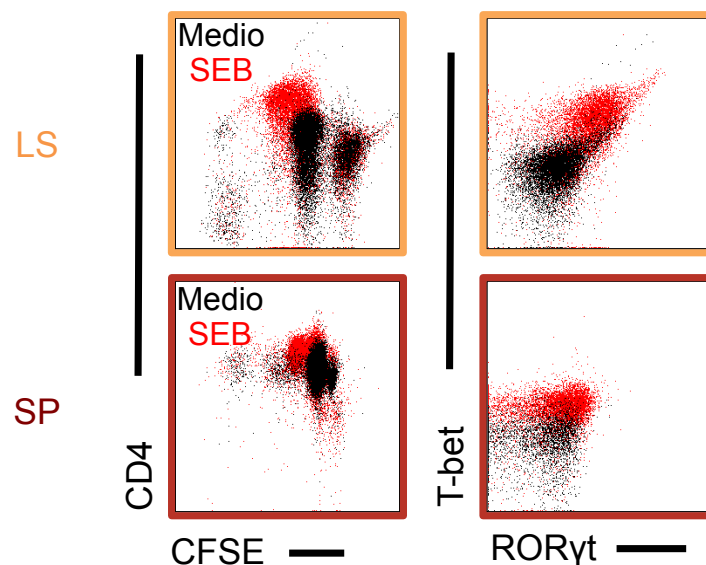


Figura 18. La estimulación con SEB induce el fenotipo patogénico en linfocitos Th17 de dermis lesionada y sangre periférica. Plots representativos de la proliferación de Linfocitos T CD4⁺ marcados con CFSE y el fenotipo patogénico (T-bet⁺ ROR γ t⁺) en células provenientes de dermis lesionada (plots naranjas) y sangre periférica (plots rojos) del mismo paciente con psoriasis. Los puntos negros representan las células sin estimular y los puntos rojos muestran las células estimuladas con SEB.

Considerando que la activación con SEB induce características patogénicas, decidimos evaluar si la estimulación vía TCR con el estímulo anti-CD3/CD28 sería capaz de inducir las mismas características patogénicas en linfocitos Th17 de dermis LS y sangre periférica. De acuerdo con la Figura 19a, el SEB induce la expresión principalmente de IFN- γ en las células Th17 dermales mientras que el anti-CD3/CD28 induce la expresión de IL-17 e IFN- γ . Al estimular las células de sangre periférica se observa que ambos estímulos inducen un patrón de citocinas muy parecido, con presencia de linfocitos Th17 IL-17⁺, IFN- γ ⁺ e IL-17⁺/IFN- γ ⁺.

Después de observar que el SEB induce las características patogénicas preferentemente en la dermis lesionada, determinamos si las células Th17 productoras de IFN- γ tenían un perfil transcripcional convencional o patogénico mediante la expresión de AhR y T-bet. La figura 19b muestra que el estímulo con SEB induce la expresión de AhR y T-bet en los linfocitos Th17 IFN- γ ⁺. Mientras que las células activadas con anti-CD3/CD28 encontramos la expresión de ambos factores de transcripción en los linfocitos Th17 IFN- γ ⁺, pero en menor medida en comparación con la estimulación con SEB. Estos datos sugieren que la estimulación con SEB induce la adquisición completa de características patogénicas funcionales en células Th17 presentes en la dermis lesionada.

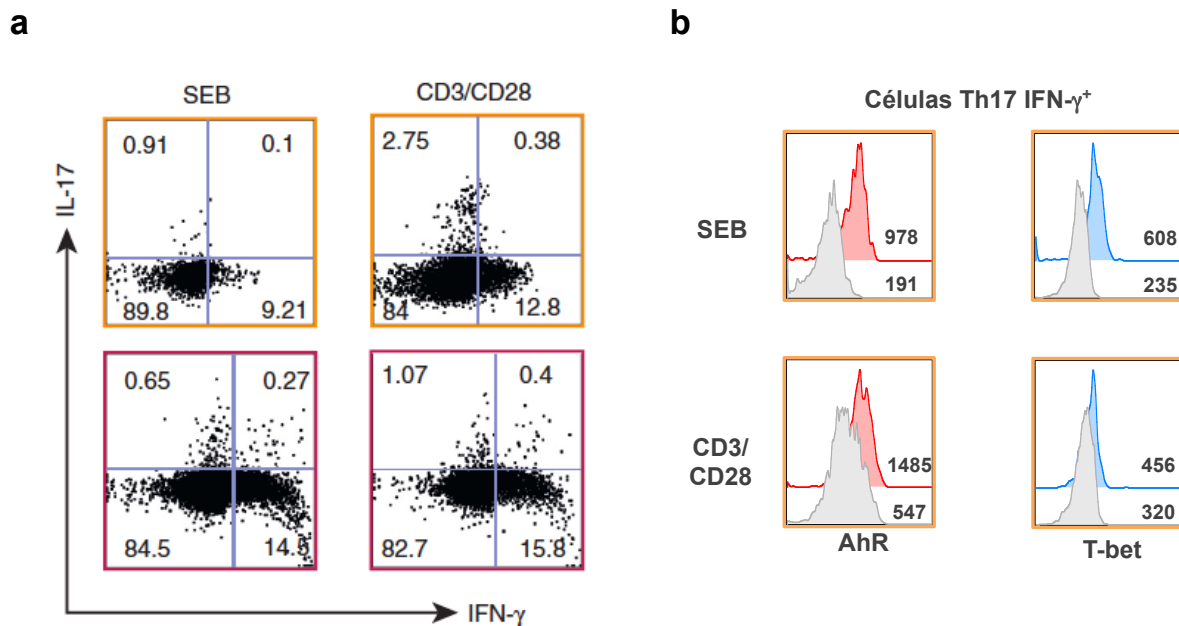


Figura 19. Los linfocitos Th17 de la dermis lesionada adquieren una mayor plasticidad funcional. a) Producción intracelular de IL-17⁺ e IFN- γ ⁺ en linfocitos Th17 de dermis lesionada (plots naranjas) y sangre periférica (plots rojos) estimulados con SEB o con anti-CD3 /CD28. **b)** Expresión de AhR y T-bet en linfocitos Th17 IFN- γ ⁺ estimulados con SEB o con anti-CD3/CD28. Los números en los histogramas muestran la intensidad media de fluorescencia en la condición sin estímulo (histograma gris) y estimulados (histograma rojo y azul).

La estimulación vía TCR induce las características patológicas en linfocitos Th17 aislados de sangre periférica

Nuestros resultados muestran la adquisición de características patológicas en los linfocitos Th17 dentro de un contexto multicelular, dificultando determinar si la estimulación a través de SEB o CD3/CD28 tiene un efecto directo o indirecto en estas células. Por lo tanto, decidimos determinar si estas características pudieran ser adquiridas en los linfocitos Th17 aislados. Para ello purificamos las células Th17 de sangre periférica de los pacientes con psoriasis, haciendo una selección magnética positiva con CD4 y utilizando el marcador CD161 (el cual ha sido reportado como un marcador de las células Th17)¹⁰⁹ para realizar la identificación y el aislamiento mediante citometría de flujo. Debido a que el mecanismo de activación del SEB requiere la presencia de una célula presentadora de antígeno, decidimos usar anti-CD3/CD28 para activar a los linfocitos Th17. Además, para

semejar las condiciones presentes en dermis LS, adicionamos IL-1 β e IL-23, las cuales se encuentran sobre-expresadas en la dermis LS¹⁷⁹.

En un primer tiempo, evaluamos la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y T-bet, encontrando que la estimulación vía TCR con anti-CD3/CD28 induce la co-expresión de ambos factores, siendo más evidente al añadir las citocinas al medio de cultivo (Figura 20a). Posteriormente evaluamos la producción de IL-17 e IFN- γ y encontramos la presencia de ambas citocinas en los linfocitos Th17 estimulados con anti-CD3/CD28. Sin embargo, al añadir citocinas, disminuyó el porcentaje de células Th17 IL-17⁺ y aumentó el de las células IFN- γ ⁺ (Figura 20b). Finalmente evaluamos la proliferación de estas células y se observó que la estimulación anti-CD3/CD28 induce proliferación pero, la presencia de IL-1 β e IL-23 favorece una proliferación más robusta, sobre todo en la ultima ronda de proliferación (Figura 20c). En conjunto, estos resultados muestran que los linfocitos Th17 aislados de sangre periférica pueden adquirir características patogénicas tras la estimulación con anti-CD3/CD28 y que en presencia de citocinas inflamatorias, esto se ve exacerbado.

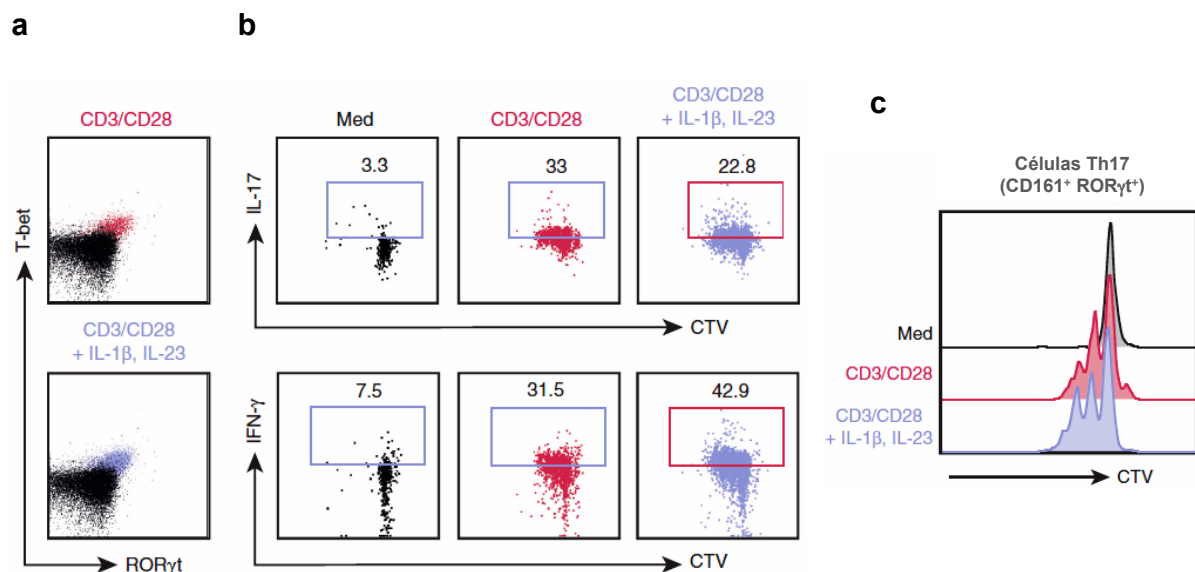


Figura 20. La activación a través de CD3/CD28 induce plasticidad fenotípica y funcional en linfocitos Th17 aislados de sangre periférica. a) Expresión T-bet y ROR γ t en células Th17 estimuladas con solo anti-CD3/CD28 (plots rojos) o con IL-1 β e IL-23 (plots azules). Los números indican el porcentaje de células productoras de las citocinas. **b)** Producción de IL-17 (plots superiores) e IFN- γ (plots inferiores) en células proliferantes marcadas con Cell Trace Violet (CTV). **c)** Histograma de la proliferación de linfocitos Th17 (CD4⁺, CD161⁺, ROR γ t⁺) en respuesta a anti-CD3/CD28 solo o en combinación con IL-1 β e IL-23. Resultados representativos de dos pacientes con psoriasis.

Identificación de células CD123^{bajo} con características de linfocitos innatos en dermis de pacientes con psoriasis

La IL-17 se considera una de las citocinas más importantes en la fisiopatología de la psoriasis, la cual es producida por los linfocitos Th17. Sin embargo, nuestros resultados indican que después de estimular con SEB, las células Th17 pierden su capacidad de expresar IL-17, abriendo la posibilidad de que células linfoides como las ILC contribuyan a la producción de esta citocina. De hecho, en las inmunofluorescencias de tejido observamos la presencia de células ROR γ ^{t+} e IL-17⁺ que son negativas para CD4 (figuras 7 y 8), sugiriendo la presencia de ILC en los tejidos de los pacientes. Trabajos previos de ILC en psoriasis han evidenciado la presencia y el incremento de la población ILC3 aunque también su incapacidad para producir IL-17^{169,170}. Nuestro grupo de trabajo reportó una población en dermis de sujetos sanos con características de ILC, que expresa el marcador CD123 (ILC CD123^{bajo}) que es capaz de producir IL-17 e IL-22¹⁷⁵. Por lo tanto, evaluamos la frecuencia de la población ILC CD123^{bajo} y de la población clásica, ILC CD127⁺ en los pacientes con psoriasis.

Para ello obtuvimos las células dermales y las analizamos mediante citometría de flujo, considerando los eventos sencillos, de la zona de linfocitos definida con base en su tamaño y complejidad. Posteriormente, se seleccionó la región linaje negativo para CD3, CD14, CD19, CD94, HLA-DR (descartando del análisis los linfocitos T, monocitos, linfocitos B, células NK y células dendríticas) y, finalmente se analizó la expresión de los marcadores CD123 y CD127, para identificar a las ILC clásicas CD127⁺ y a la ILC CD123^{bajo} (Figura 21a). Encontramos que la población ILC CD123^{bajo} tiende a incrementarse en la dermis NLS mientras que en dermis LS el incremento es significativo en comparación con la población de sujetos sanos. En el caso de la población ILC CD127⁺ observamos una tendencia a incrementar su frecuencia tanto en dermis NLS y dermis LS (Figura 21b). Estos resultados muestran que en la dermis LS y NLS existen dos poblaciones de ILC, las clásicas definidas por la expresión de CD127 y otra que comparte marcadores de ILC con las clásicas pero caracterizada por la presencia del marcador CD123.

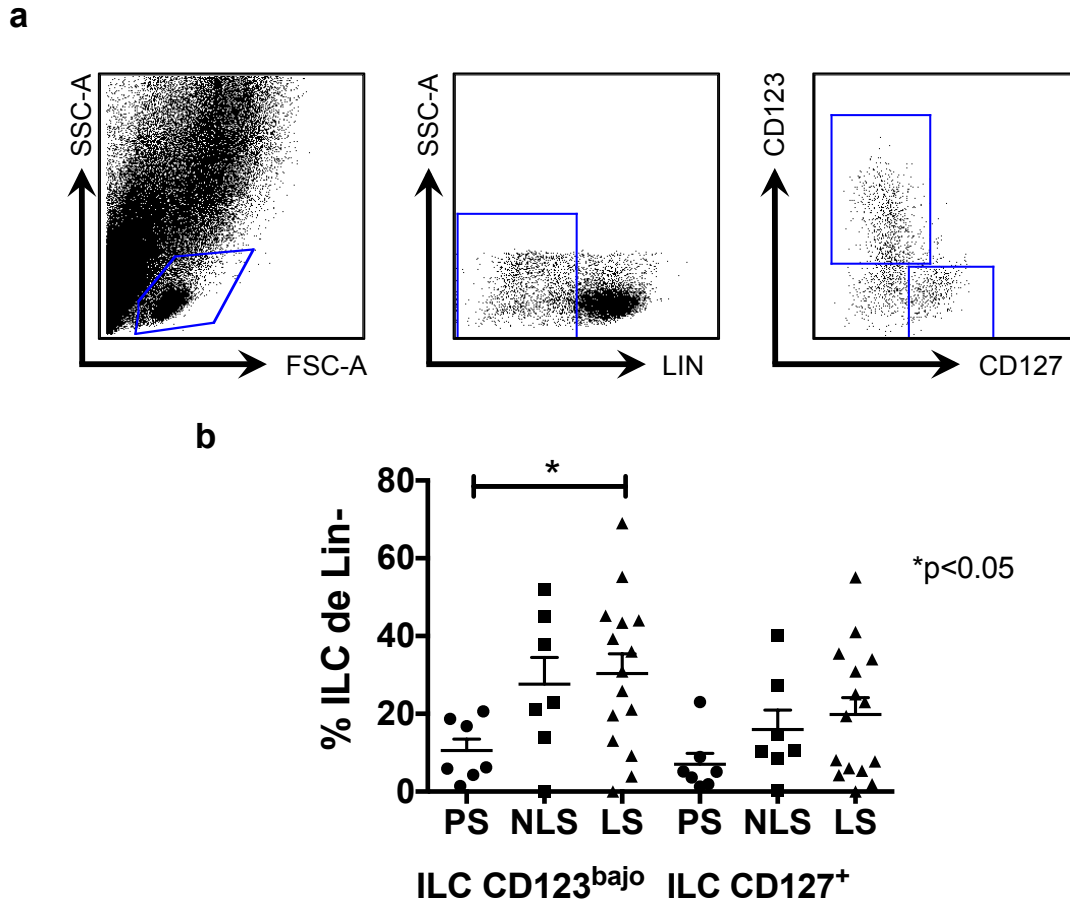


Figura 21. La población con características de ILC CD123^{bajo} está incrementada en dermis lesionada de pacientes con psoriasis. o. a) Estrategia de análisis Lin⁻ (CD3, CD14, CD19, CD94, HLA-DR). Se identificaron a dos poblaciones ILC, una positiva para el marcador CD123 (ILC CD123^{bajo}) y otra para el marcador CD127 (ILC CD127⁺) **b)** Porcentajes de las poblaciones ILC CD123^{bajo} y ILC CD127⁺ en dermis sana (PS, n=7), dermis no lesionada (NLS, n=7) y dermis lesionada (LS, n=15). *p<0.05. U de Mann Whitney.

La población ILC CD123^{bajo} presente en la dermis lesionada produce IL-17 e IL-22 de manera basal y después de la activación

Después de observar la presencia y el incremento en la frecuencia de la población ILC CD123^{bajo} decidimos evaluar su capacidad de producir citocinas asociadas con la psoriasis como son IL-17 e IL-22. Para ello, estimulamos a las células con un coctel de IL-1 β , IL-2 e IL-23, el cual activa a las ILC en presencia de PMA/ionomicina.

Al analizar la población ILC CD123^{bajo} en dermis de sujetos sanos observamos que sin estimulación no hay producción de las citocinas mientras que después de la activación hay células IL-17⁺, IL-22⁺ y células dobles productoras de IL-17 e IL-22. Al evaluar las células de la dermis NLS encontramos que, sin estimulación, las células ILC CD123^{bajo} son capaces de producir IL-17 e IL-22, siendo similar aun después de la activación. Cuando evaluamos la producción de estas citocinas en células provenientes de dermis LS observamos el mismo comportamiento: sin estimulación, las células ILC CD123^{bajo} son capaces de producir IL-17 e IL-22 y que esta producción no cambia después de la activación (Figura 22).

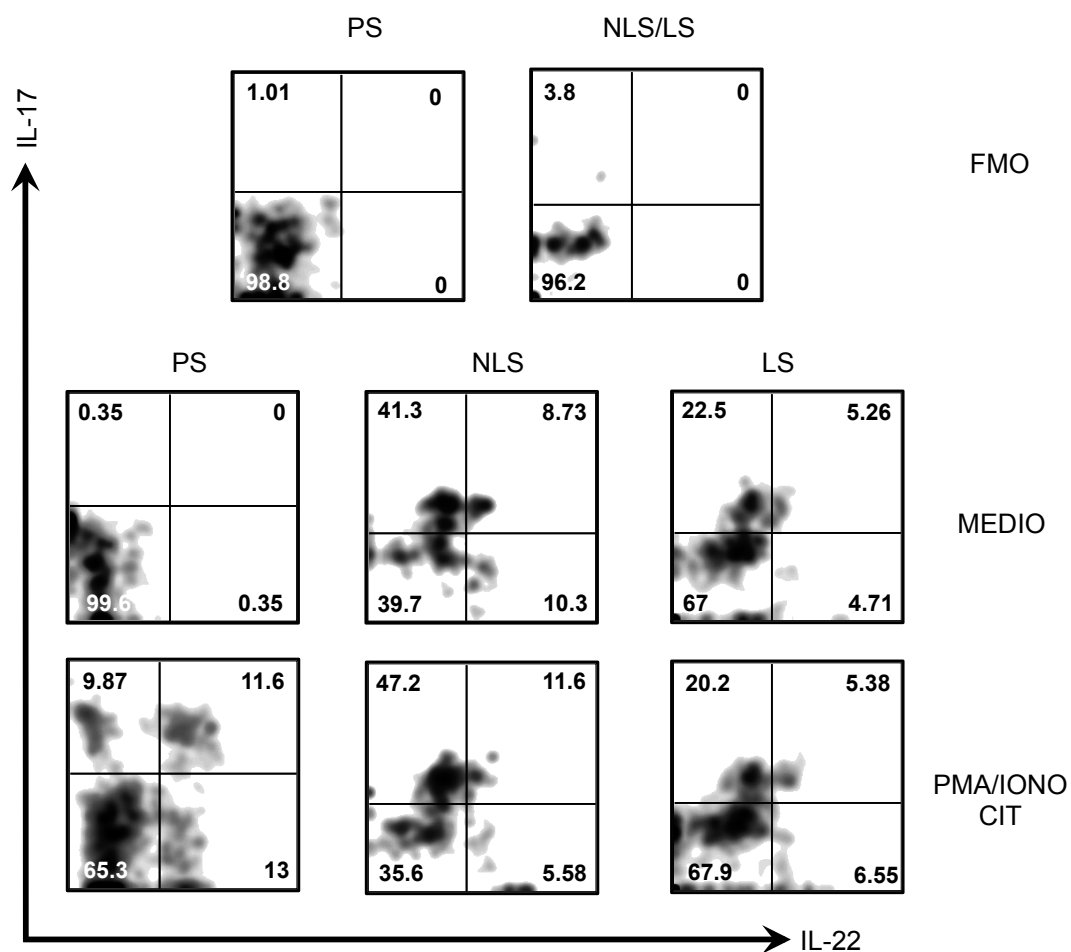


Figura 22. La población ILC CD123^{bajo} produce IL-17 e IL-22 aun sin estimulación en dermis sin lesión y lesionada de pacientes con psoriasis. Producción de IL-17 e IL-22 intracelular en la población ILC CD123^{bajo}, obtenidas de dermis sana (PS), dermis no lesionada (NLS) y dermis lesionada (LS). Los gráficos superiores muestran las citocinas en la condición fluorescencia menos uno (FMO), los plots intermedios son los resultados en la condición sin estímulo mientras que los gráficos inferiores revelan las citocinas en respuesta a PMA/Iono en conjunto con IL-1 β , IL-2 e IL-23 (CIT).

Al cuantificar las células productoras de citocinas en los pacientes observamos que el porcentaje de ILC CD123^{bajo} IL-17⁺ está incrementado en la dermis lesionada en comparación con la dermis sana. Además, este incremento se observa en células que no fueron estimuladas con el coctel de PMA/ionomicina-citocinas. De manera contrastante, la población ILC CD127⁺ no aumentó su porcentaje de células IL-17⁺ antes o después de la activación (figura 23a). En la figura 23b observamos que la población ILC CD123^{bajo} es capaz de producir IL-22 en ausencia de estimulación y que la producción se mantiene sin cambios después de la activación, además de estar aumentada significativamente en comparación con células de sano. Con respecto a la población ILC CD127⁺, encontramos una tendencia a incrementar la producción de IL-22 después de la estimulación. Estos resultados muestran que la población ILC CD123^{bajo} tiene una mayor capacidad de producir IL-17 e IL-22 en comparación con la población clásica ILC CD127⁺.

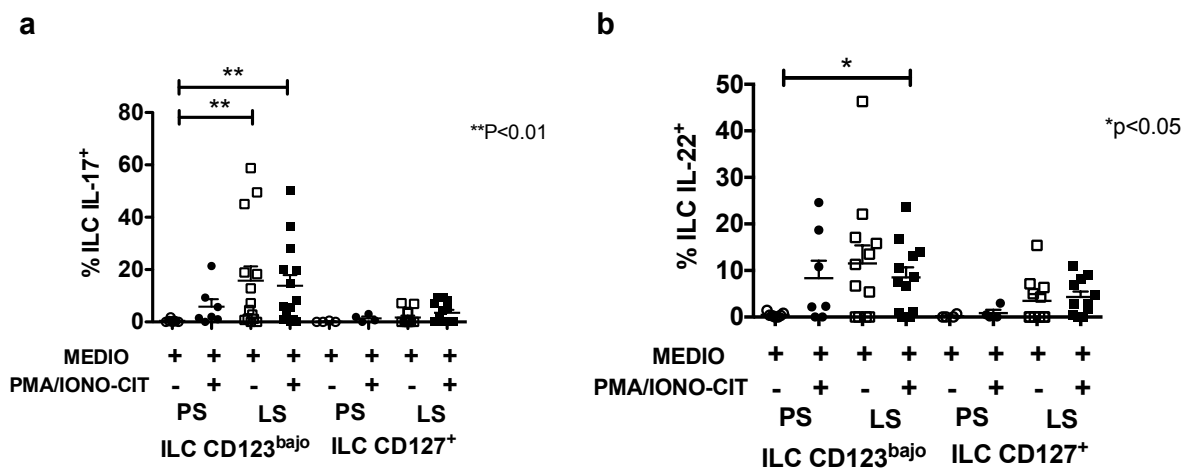


Figura 23. La población ILC CD123^{bajo} incrementa la producción de IL-17 e IL-22 en dermis lesionada de pacientes con psoriasis. Porcentaje de células productoras de a) IL-17 e b) IL-22 en las poblaciones ILC CD123^{bajo} y ILC CD127⁺ en dermis sana (PS) y dermis lesionada (LS) de pacientes con psoriasis estimuladas con PMA/Ionomicina más IL-1 β , IL-2 e IL-23 más PMA/Ionomicina. Dermis sana (PS), n=7, dermis lesionada (LS), n=12. U de Mann Whitney. *p<0.05, **p<0.01.

En los pacientes con psoriasis se ha reportado un incremento en citocinas pro-inflamatorias en la piel no lesionada¹⁷⁹. Esto, aunado al incremento de la población ILC CD123^{bajo} en la dermis NLS, nos llevo a determinar la capacidad de las poblaciones ILC CD123^{bajo} e ILC CD127⁺ de producir de IL-17 en este sitio. Al analizar la dermis NLS encontramos una tendencia a incrementar la producción de IL-17 aun sin estimulación, la cual no se modifica después de la estimulación en ambas poblaciones de ILC (figura 24).

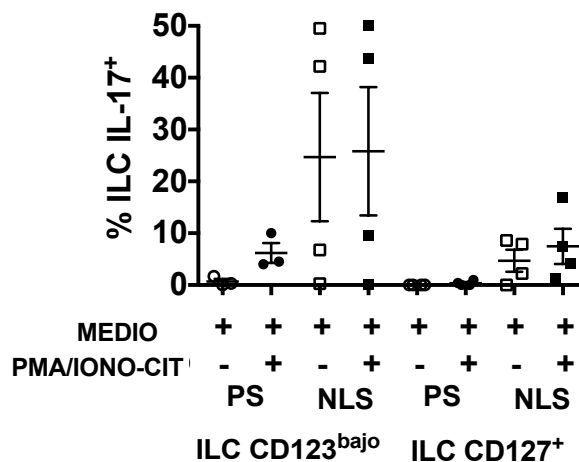


Figura 24. La población ILC CD123^{bajo} tiende a incrementar la producción de IL-17 en dermis no lesionada de pacientes con psoriasis. Porcentaje de células productoras de IL-17 en las poblaciones ILC CD123^{bajo} e ILC CD127⁺ en dermis sana (PS) y dermis sin lesión (NLS) de pacientes con psoriasis estimuladas con PMA/Ionomomicina más IL-1 β , IL-2 e IL-23. Dermis sana (PS), n=3; dermis no lesionada (NLS), n=4. U de Mann Whitney.

En conjunto, los resultados anteriores muestran que en comparación con la población ILC CD127⁺ la población ILC CD123^{bajo} podría tener un mayor potencial de contribuir en la fisiopatología de la psoriasis debido a la producción de IL-17 e IL-22 de manera basal y después de activación.

VII. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria multifactorial donde el sistema inmune tiene un papel importante en la patología. En un principio, se encontró la presencia de células dendríticas en las lesiones que favorecían la producción de IFN- γ por los linfocitos T CD4³⁷. Sin embargo, las evidencias más recientes señalan que la IL-17 también tiene un rol importante en la enfermedad. Es por ello que en este trabajo evaluamos a las poblaciones linfoides adaptativas e innatas - en específico a los linfocitos Th17 y a la población ILC CD123^{bajo}- capaces de producir IL-17.

Los trabajos que revelan la presencia de linfocitos Th17 en psoriasis se han enfocado en evaluar la producción de IL-17 en células CD4, lo cual podría dejar fuera del análisis a aquellos linfocitos Th17 que en ese momento no produzcan IL-17 aunque posean el fenotipo¹⁸⁰. Por lo tanto, determinamos la presencia de células Th17 mediante la expresión del factor de transcripción maestro ROR γ t, el cual regula su fenotipo y función. Los resultados obtenidos en tejido así como por citometría de flujo muestran que existen células T CD4⁺ ROR γ t⁺ cuya frecuencia es mayor en la dermis LS. Adicionalmente, con el uso de ROR γ t se pudo observar células linfoides adaptativas e innatas que tienen el potencial de producir IL-17. Al identificar células mediante la expresión de IL-17 nos permitió observar linfocitos Th17 y células CD4⁻ que producen IL-17, lo que sugiere la presencia de células linfoides tanto innatas como adaptativas en la dermis LS. Consideramos que sería interesante determinar si en la dermis de los pacientes existen otras células productoras de IL-17 como son los linfocitos T γ δ y los neutrófilos.

El fenotipo y función de las células Th está controlado por la expresión de factores de transcripción los cuales, en el estudio de los linfocitos Th17 en psoriasis no se han contemplado. La evidencia derivada de modelos animales muestra la existencia de dos subpoblaciones de linfocitos Th17, los convencionales y los patogénicos. De acuerdo a sus características, se ha propuesto que las células patogénicas promueven la severidad en modelos de colitis o EAE¹⁰⁵. Sin embargo, en psoriasis se desconocía si un estímulo asociado con la severidad de la enfermedad como el SEB pudiera impactar en el fenotipo y función de los linfocitos Th17. Los resultados

obtenidos en este trabajo muestran que la estimulación con SEB induce un incremento en ROR γ t, T-bet en la NLS y LS mientras que Runx1 sólo se incrementa en la dermis LS, lo cual podría sugerir que sólo en la lesión se está induciendo el fenotipo patogénico. Esto concuerda con los porcentajes obtenidos de linfocitos convencionales (ROR γ t⁺, Runx1^{+/-} T-bet⁻) y patogénicos (ROR γ t⁺, Runx1^{+/-} T-bet⁺), donde la proporción de los linfocitos Th17 convencionales disminuyen y la de los patogénicos aumenta después de la activación con SEB, sólo en dermis lesionada.

Para determinar si estos cambios en los factores de transcripción impactaban la funcionalidad de los linfocitos Th17, evaluamos la producción de IL-17 e IFN- γ de esta manera determinamos si tenían un comportamiento convencional o patogénico. Encontramos que la estimulación con SEB induce principalmente la producción de IFN- γ , sugiriendo la inducción de características patogénicas funcionales en los linfocitos Th17. Esto podría ser explicado por la expresión de ROR γ t, T-bet y Runx1 en las células Th17 donde en ausencia de T-bet, ROR γ t puede formar dímeros con Runx1 y favorecer la expresión de IL-17. Sin embargo, en presencia de T-bet, Runx1 forma dímeros con este factor de transcripción, favoreciendo la expresión de IFN- γ y reprimiendo la expresión de ROR γ t y ocasionando una disminución de IL-17¹¹⁶. Además de inducir la expresión de Runx1, la estimulación de células T con SEB puede inducir la expresión de IFN- γ ¹⁸¹, lo que podría contribuir aun más a la adquisición de características patogénicas, aunque consideramos necesario realizar trabajos posteriores para dilucidar este proceso.

Este mecanismo podría explicar el incremento de IFN- γ sin embargo, no explicaría porqué los linfocitos Th17 pierden su capacidad de producir IL-17, ya que observamos que la estimulación con SEB induce un incremento significativo de ROR γ t en los linfocitos. Eso sugiere que el mecanismo de regulación negativa del perfil Th17 por parte de Runx1 no funciona en estos linfocitos Th17. Es por ello que consideramos sería relevante conocer las vías de señalización o los cambios epigenéticos que induce el SEB que pudieran explicar la adquisición de plasticidad en los linfocitos Th17.

Los linfocitos Th17 patogénicos han sido asociados a cuadros más severos de colitis o EAE. En humanos, se han visto incrementados en enfermedades inflamatorias crónicas, lo que podría sugerir que participan en la enfermedad. Para el caso de la psoriasis no se ha encontrado asociación entre la severidad de la enfermedad y la presencia de estos linfocitos patogénicos. El PASI es un índice que contempla el eritema, la descamación y la induración de las lesiones así como el área corporal afectada, con lo cual se calcula la severidad de la enfermedad. Nuestros resultados muestran que la estimulación con SEB induce un incremento de linfocitos Th17 patogénicos a partir de células obtenidas de lesiones de pacientes con placas grandes en comparación con las de pacientes con placas pequeñas. Esto podría sugerir que existen diferentes mecanismos fisiopatológicos en las lesiones grandes donde los linfocitos Th17 patogénicos podrían estar participando de manera activa. Se ha reportado que en las lesiones psoriásicas existen células dendríticas que producen CCL20 en respuesta a IFN- γ ¹⁸², favoreciendo el reclutamiento de más células Th17 a la lesión. De tal modo que el incremento de IFN- γ observado después de la estimulación con SEB podría ser un mecanismo que favorece el reclutamiento de linfocitos Th17 a la piel lesionada. Una vez en el sitio, podrían adquirir las características patogénicas, promoviendo la generación de placas más grandes.

Es importante resaltar que el efecto del SEB en la función de las células Th17 parecer ser exclusivamente de la piel lesionada, ya que al evaluar piel NLS, piel sana o incluso piel con otra dermatosis como la dermatitis atópica, no observamos cambios en la expresión de ROR γ t ni incremento en la producción de IFN- γ . Se ha reportado que el repertorio de los linfocitos T presente en la LS está compuesto principalmente por los V β 2,5,6,7,9,17 y 18^{183,184} y el SEB es capaz de interactuar con ciertos V β como 1.1, 3, 3.2, 6, 12, 13.2, 14, 15, 15.1, 17 y 20^{185,186}. Estos datos sugieren que en piel lesionada de pacientes con psoriasis existen clonas que son susceptibles a interactuar con el SEB, lo cual explicaría la distribución de nuestros resultados obtenidos, al comparar las diferentes biopsias de piel.

Otro aspecto que evaluamos fue el microambiente inducido por el SEB en la dermis no lesionada y lesionada. Los resultados muestran un incremento en IL-17, IFN- γ ,

TNF- α e IL-22, sugiriendo que el SEB genera un ambiente patogénico. Debido a que los experimentos se realizaron en un contexto multicelular no podemos atribuir la producción de estas citocinas exclusivamente a los linfocitos T, abriendo la posibilidad de que otras células, como las ILC, contribuyan a su producción. Además, las citocinas que encontramos inducidas por el SEB pueden influenciar el fenotipo de las células Th17 así como contribuir al ambiente inflamatorio en psoriasis. Por ejemplo, se ha demostrado que el TNF- α presente en pacientes con artritis favorece la plasticidad de las células Th17 hacia un perfil Th1¹⁸⁷, lo cual podría estar ocurriendo en los pacientes con psoriasis.

En contraste, citocinas relacionadas con funciones reguladoras como la IL-9 está en bajas cantidades o es casi nula en los pacientes con mayor severidad y esto correlaciona negativamente con la severidad de la enfermedad. La IL-9 es una citocina con múltiples funciones inmunológicas¹⁸⁸, entre las cuales está el promover la función de las células T reguladoras¹⁸⁹. Recientemente se ha propuesto que la IL-9 producida por ILC2 es esencial para la resolución de la inflamación en un modelo de artritis¹⁹⁰. Considerando esto, es posible que la falta de IL-9 en los pacientes con mayor PASI pudiera ser otro factor que, junto con la adquisición de características patogénicas en los linfocitos Th17, contribuya al mantenimiento de la inflamación.

Otra posibilidad que explicaría el incremento en linfocitos Th17 patogénicos y baja producción de IL-9 sería la presencia o ausencia de TGF- β . Es probable que la estimulación con SEB disminuya los niveles de TGF- β y de esta manera se favorezca la diferenciación de las células Th17 hacia el perfil patogénico. Adicionalmente, se ha reportado que TGF- β induce la expresión de IL-9, por lo que su ausencia conllevaría a la pérdida de IL-9¹⁹¹. En futuros experimentos sería relevante determinar como se encuentra TGF- β en las lesiones de los pacientes con psoriasis.

Trabajos previos realizados en pacientes, han encontrado el incremento en sangre periférica de linfocitos T CD4⁺ que co-expresan IL-17 e IFN- γ . Sin embargo, no se había explorado si estas células podrían adquirir características patogénicas en sangre periférica o si esto solo ocurre en piel. Encontramos que el SEB induce una

mayor proliferación y expresión de T-bet en linfocitos Th17 de dermis LS mientras que las células de sangre periférica tienen un incremento más discreto. Esto podría sugerir que en piel existen factores adicionales que contribuyen a la adquisición del fenotipo patogénico. Considerando estas características proponemos que el aumento de linfocitos Th17 patogénicos en dermis LS pudiera ser resultado de dos mecanismos como son la expansión clonal y la inducción de plasticidad.

El primer mecanismo podría ser apoyado debido a que las células patogénicas tienen una mayor capacidad de proliferación así como una menor supresión por parte de las células T reguladoras^{125,126}. Además, se ha encontrado que los linfocitos T presentes en las lesiones psoriásicas tienen un fenotipo de memoria^{192,193} sugiriendo que, durante la presentación de antígeno, adquieren estas características patogénicas y que en presencia de SEB se induce su expansión clonal. Recientemente un análisis de clonalidad presente en dermis lesionada y dermis donde se resolvió la lesión, demostró que los sitios que resolvieron las lesiones contienen clones con potencial patogénico, entre ellas las que expresan V β 2, 6 y 13¹⁹³. Esto sugiere que las células susceptibles a interactuar con el SEB se encuentran residiendo en la dermis de los pacientes y podrían ser expandidas. Sería interesante determinar cuales son las clones expandidas por el SEB así como su especificidad ya que esta estimulación policlonal pudiera estar activando linfocitos residentes que reconocen antígenos bacterianos y que en teoría no estarían asociados con la psoriasis.

Con respecto a la inducción de plasticidad los datos que reportamos indican que los linfocitos Th17 IFN- γ ⁺ incrementan la expresión de ROR γ t T-bet y mantienen características de Th17 como la expresión del AhR, sugiriendo fuertemente que el SEB favorece la plasticidad. En la dermis lesionada de pacientes con psoriasis se encuentran células dendríticas que polarizan a los linfocitos T hacia un perfil Th1 y Th17⁹⁵, lo cual podría favorecer la adquisición de características patogénicas. Además, se ha demostrado que las células dendríticas pueden trans-presentar la IL-6 unida a la forma soluble del IL-6R α , generándose cúmulos de IL-6 capaces de inducir la diferenciación de linfocitos Th17 patogénicos¹⁹⁴. De manera interesante, nuestros resultados son semejantes a lo observado en la inducción de plasticidad de

linfocitos Th17 después de la infección con *H. hepaticus*, donde se observó que los linfocitos T IL-17⁺ IFN- γ ⁺ incrementaban la expresión de T-bet y mantenían las características Th17 como la expresión de ROR γ t y AhR¹²¹. Esta evidencia apoyaría que la plasticidad es un mecanismo activo que posiblemente está participando en la generación de linfocitos Th17 patogénicos en dermis LS¹⁹³.

El presente trabajo evalúa la plasticidad considerando los factores de transcripción ROR γ t, T-bet y Runx1. Sin embargo, recientemente se ha propuesto una red de factores de transcripción que regulan el perfil Th17¹⁹⁵. Se encontró que BATF, IRF4 y STAT3 se encuentran río arriba de ROR γ t, por lo que estos serían importantes para la adquisición del perfil Th17. Por lo tanto, además del epigenoma, el estudio del transcriptoma en los linfocitos Th17 de pacientes con psoriasis ayudaría a explicar la plasticidad observada en estas células.

Nuestros resultados muestran que la plasticidad de los linfocitos Th17 purificados puede ser adquirida cuando se estimulan vía TCR (anti-CD3/CD28) y se incrementa con la adición de citocinas presentes en la LS como IL-1 β e IL-23. Esto sugiere que los linfocitos Th17 tienen una gran plasticidad ya que la simple estimulación vía TCR es capaz de originar cambios en su fenotipo y función. Además, esta plasticidad se vio incrementada en presencia de IL-1 β e IL-23, dos citocinas que se consideran parte del ambiente inflamatorio en psoriasis¹⁷⁸. En el caso de IL-1 β , se ha propuesto que es importante al inicio de la polarización Th17⁸⁶ aunque también puede inducir un fenotipo patogénico en los linfocitos Th17¹²³, lo cual podría explicar el incremento en IFN- γ y la disminución de IL-17. Para el caso de la IL-23, se han reportado mutaciones en IL-23R que incrementan la susceptibilidad de padecer psoriasis; sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual esto ocurre. Una posibilidad es que la IL-23 podría participar en la plasticidad debido a su capacidad de señalizar a través de STAT4 así como inducir la proliferación de los linfocitos Th17⁶³.

Es importante mencionar que los linfocitos Th17 tienen permisivo el locus de IFN- γ , lo que permite la facilidad para ser expresado en estas células¹¹⁰. Sin embargo, sería muy importante determinar el estado de la cromatina en los linfocitos Th17 de pacientes con psoriasis, lo cual ayudaría a explicar dos de los resultados que

obtuvimos. El primero es la capacidad para expresar IFN- γ y T-bet después de la estimulación vía TCR, esto sugiere que la cromatina se encuentra permisiva en este loci. El segundo es el incremento en ROR γ t, acompañado de una baja expresión de IL-17, lo que podría sugerir que el locus de IL-17 no está permisivo para la transcripción.

La presencia de linfocitos T que expresan la cadena V β 6 que son susceptibles a interactuar con el SEB y la asociación de las infecciones en garganta con *S. pyogenes* o *S. aureus* con el inicio de la psoriasis⁶ sugieren la participación de las infecciones bacterianas en el desarrollo de la enfermedad. Aunque los pacientes con psoriasis aparentemente no tienen infecciones en la piel, en nuestro trabajo encontramos que las biopsias de pacientes con mayor severidad se contaminaban con mayor facilidad durante su cultivo, sugiriendo un incremento en la carga bacteriana y una relación entre la severidad y la carga bacteriana. Por lo tanto, consideramos que infecciones cutáneas con bacterias como *S. aureus* u otras que expresan superantígenos podrían ser dañinas para los pacientes con psoriasis. Esto podría deberse a la inducción de características patogénicas en linfocitos Th17, así como el impacto a nivel tisular donde el microambiente inducido por los superantígenos o las bacterias podrían perpetuar la inflamación. Sin embargo, consideramos relevante determinar si la dermis LS está colonizada con *S. aureus*, si hay presencia del SEB y su correlación con el PASI. También sería interesante determinar como se encuentra la expresión y función de algunos péptidos antimicrobianos que controlen la colonización bacteriana así como la integridad de la piel.

En los últimos años se ha evidenciado que las citocinas Th no son exclusivas de los linfocitos T ya que las ILC también son capaces de producirlas y de cumplir funciones similares a las células T¹⁹⁶. En psoriasis, la evidencia sugiere que las ILC3 están incrementadas así como su capacidad de producir IL-22. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se demostró que las ILC3 expresaran IL-17^{169,170}, quedando la posibilidad de que otras poblaciones de ILC pudieran contribuir con la producción de esta citocina. Considerando un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo donde identificamos a una población con características de ILC denominada

ILC CD123^{bajo}, misma que expresa ROR γ t e IL-17 y que se encuentra en piel sana¹⁷⁵, decidimos evaluar la frecuencia de esta población así como su función en la dermis de pacientes con psoriasis.

Encontramos que la población ILC CD123^{bajo} está incrementada en la dermis LS en comparación con la población clásica ILC CD127⁺. Una posible explicación a este incremento es debido a la alta capacidad migratoria de estas células hacia piel. Previamente reportamos que la población ILC CD123^{bajo} de sangre periférica tiene una alta expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 y, de manera interesante, encontramos que su ligando [el factor 1 derivado del estroma (SDF-1)] se encuentra incrementado en dermis lesionada. Esta población ILC CD123^{bajo} fue capaz de movilizarse en respuesta a SDF-1 así como a los sobrenadantes de dermis lesionada, sugiriendo que pudieran localizarse en la dermis lesionada de los pacientes con psoriasis¹⁷⁵. En enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn se ha observado que las ILC se encuentran incrementadas¹⁶¹, lo que también sugiere su posible participación en la enfermedad. Considerando esto, nuestros resultados parecen indicar que la población ILC CD123^{bajo} podría contribuir en la psoriasis. Desconocemos si el incremento en la población ILC CD123^{bajo} en la LS es a consecuencia del ambiente inflamatorio o si son las inductoras de las lesiones. Sin embargo, teniendo en cuenta que el eje CXCR4/SDF-1 pudiera estar implicado en el reclutamiento de la población ILC CD123^{bajo}, consideramos interesante explorar si el uso de anticuerpos que bloqueen la migración celular de esta población podrían ser efectivos en el tratamiento de la psoriasis tal y como se ha propuesto en los modelos animales de psoriasis con imiquimod¹⁹⁷.

La población ILC CD123^{bajo} es capaz de producir IL-17 e IL-22 después de su estimulación. Sin embargo, el dato más interesante es que estas células pueden producir citocinas sin una estimulación adicional *in vitro* sugiriendo que en piel lesionada, las células se encuentran activadas. Se ha demostrado que en la dermis lesionada de los pacientes hay un incremento en citocinas como IL-1 β , IL-6 e IL-23, con lo cual se tendrían las condiciones necesarias para inducir la activación de las ILC y de la población ILC CD123^{bajo}. Al hacer el análisis de los resultados obtenidos con todos los pacientes encontramos que la población ILC CD123^{bajo} proveniente de

dermis LS incrementa su expresión de IL-17 e IL-22, mientras que en la población ILC CD127⁺ no observamos el incremento en ninguna de estas citocinas. Estos resultados sugieren que la población ILC CD123^{bajo} contribuye con la producción de una citocina clave en la fisiopatología de la psoriasis. Sería interesante determinar los niveles de expresión de los receptores de IL-1 β , IL-6 e IL-23 en ambas poblaciones y evaluar si se asocia a una mayor susceptibilidad de ser activada, así como evaluar otros estímulos que pudieran generar la activación de la población ILC CD127⁺.

La población identificada en nuestro grupo de trabajo se caracteriza por la expresión de la cadena alfa (CD123) y que junto con la cadena beta común (CD131) forman el receptor de IL-3. Este receptor se expresa en células mieloides como basófilos, eosinófilos y células cebadas, mientras que células de la rama linfóide como las células dendríticas plasmacitoides expresan este receptor¹⁹⁸. Una hipótesis que podría contribuir a las diferencias observadas en la población ILC CD123^{bajo} en comparación con ILC CD127⁺ es precisamente la expresión de CD123, ya que la presencia de IL-3 en el medio de cultivo incrementa la supervivencia de esta población¹⁷⁵. Y si tomamos en cuenta que la IL-3 es producida principalmente por linfocitos T activados¹⁹⁹ así como por los linfocitos Th17 patogénicos¹²⁴ los cuales se encuentran en la LS, entonces sería probable que la población ILC CD123^{bajo} permanezca durante mucho más tiempo en dermis LS y pueda tener un mayor grado de activación.

En la dermis NLS encontramos las poblaciones ILC CD123^{bajo} y ILC CD127⁺ y en algunos pacientes encontramos un incremento en las células ILC CD123^{bajo} capaces de producir IL-17 e IL-22 sin estimulación adicional, algo similar a lo observado en la LS. Estos resultados podrían sugerir que el ambiente pro-inflamatorio existente en la NLS es capaz de activar a células ILC CD123^{bajo}, aunque no podríamos asegurar que estén implicadas en el desarrollo de las lesiones. Probablemente el uso de un modelo en ratón en ausencia de células T e ILC nos permitiría establecer si la población ILC CD123^{bajo} activada participa en el desarrollo de las lesiones.

Los mecanismos que regulan la actividad de las ILC se encuentran poco explorados. Recientemente se ha descrito que las ILC3 de intestino expresan RANKL-RANK y que esta interacción mantiene niveles bajos de IL-17 e IL-22. En ausencia de esta interacción ligando-receptor, las ILC3 se vuelven más responsivas a IL-23 y producen elevadas cantidades de IL-17 e IL-22 además de incrementar la expresión de ROR γ t²⁰⁰. RANKL está implicado en la resorción ósea y se ha propuesto como un biomarcador para pacientes con psoriasis artrítica²⁰¹. Sería interesante explorar si este mecanismo regulador de las ILC se encuentra activo en los pacientes con psoriasis.

En psoriasis se ha reportado que infecciones en garganta por *S. aureus* y *S. pyogenes* pueden estar asociadas con el inicio de la enfermedad^{1,6}. Sin embargo, es poco común que la dermis lesionada presente procesos infecciosos, aunque es clara la presencia de la microbiota. Considerando este contexto, la presencia del SEB podría modificar la respuesta de los linfocitos Th17 y de las ILC al mismo tiempo. Por una parte, su interacción con el TCR puede generar la adquisición de las características fenotípicas y funcionales patogénicas en las células Th17. Mientras que la interacción del SEB con MHC puede inducir la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-23 en las células presentadoras de antígeno²⁰², confiriéndoles el potencial de activar a las ILC presentes en las lesiones psoriásicas. Por lo tanto consideramos que la presencia de bacterias con la capacidad de expresar superantígenos podría ser perjudicial para los pacientes con psoriasis al promover la activación de linfocitos innatos y adaptativos.

Las citocinas del microambiente de la LS pueden ser otro factor que promueva la respuesta simultánea de los linfocitos Th17 y las ILC. La presencia de IL-1 β e IL-23 pudiera estar favoreciendo el fenotipo patogénico en los linfocitos Th17 y la activación y producción de IL-17 e IL-22 en la población ILC CD123^{bajo}. De hecho, una de las terapias con anticuerpos utilizadas en los pacientes con psoriasis es la administración de ustekinumab (un anticuerpo anti-IL-23, dirigido contra la subunidad IL-12p40 de la IL-12 e IL-23) el cual reduce hasta en un 75% el PASI²⁰³. Un nuevo anticuerpo, el risankizumab, que reconoce la subunidad p19 de la IL-23 ha mostrado una reducción de la psoriasis en el 90% de los pacientes²⁰⁴. La otra

terapia con anticuerpos que ha mostrado ser efectiva en psoriasis es el anti-IL-17 (ixekizumab), el cual también genera la mejora de aproximadamente el 90% de los pacientes²⁰⁵. De acuerdo a nuestros resultados, los linfocitos Th17 tienen una menor producción de IL-17 después de ser estimulados. Esto sugeriría que la efectividad del ixekizumab es debida al bloqueo de la IL-17 producida por otras células innatas como pudiera ser la población ILC CD123^{bajo} o neutrófilos. Sería interesante evaluar el fenotipo y función de los linfocitos Th17 y las ILC CD123^{bajo} durante la terapia con anticuerpos para determinar si disminuye su activación o si estas poblaciones tienen el potencial de ser biomarcadores para evaluar la respuesta de los pacientes a la terapia.

Nuestro trabajo evaluó las poblaciones de células linfoides innatas y adaptativas que potencialmente podrían participar en la psoriasis. Aunque no las analizamos de manera simultánea, existen elementos de la enfermedad que podrían promover su acción de manera individual o simultánea. Durante mucho tiempo se consideró a la psoriasis como una enfermedad autoinmune, apoyada por la presencia de linfocitos T CD4 y CD8 capaces de reconocer los autoantígenos propuestos. Sin embargo, la presencia de mutaciones en los componentes de la vía de NF- κ b así como la contribución de neutrófilos, células dendríticas plasmacitoides e ILC al ambiente inflamatorio, abre la posibilidad de que la psoriasis sea una enfermedad autoinflamatoria^{15,17,167,206}.

Tomando en cuenta estos antecedentes, nuestro trabajo apoya ambas posibilidades ya que encontramos la presencia de linfocitos Th17 patogénicos los cuales podrían estar implicados en la generación de placas psoriásicas grandes. Aunque no lo demostramos, es probable que las células Th17 expresen algunos V β susceptibles de interactuar con el SEB o de reconocer autoantígenos que estén incrementados en las lesiones psoriásicas. Mientras que el incremento de citocinas inflamatorias en la dermis LS y NLS que pudieran impactar en la producción de IL-17 e IL-22 por parte de la población ILC CD123^{bajo} sugieren la presencia de un componente autoinflamatorio.

Teniendo en cuenta que la psoriasis se desarrolla en un ambiente multicelular innato y adaptativo, consideramos relevante el estudio de las poblaciones linfoides innata y adaptativa ILC CD123^{bajo} y Th17. En este contexto, nuestros resultados muestran que en la lesión co-existen estos tipos de linfocitos que podrían contribuir a la inflamación. Sin embargo, determinar en que momento la psoriasis puede estar mediada por inmunidad innata o adaptativa, es algo que consideramos seria de mucha relevancia. Con nuestros resultados podríamos sugerir la existencia de tres posibles escenarios en la fisiopatología de la psoriasis donde participan los linfocitos adaptativos e innatos.

En el primero consideramos que la población ILC CD123^{bajo}, al estar en sitios donde no hay lesión, podría participar en la formación de la lesión (donde primero debería actuar el factor disparador). Mientras que los linfocitos Th17 patogénicos podrían estar participando en el mantenimiento de las lesiones, sobre todo si consideramos que en tiempos prolongados, la presencia de autoantígenos o bacterias podría verse incrementadas. En el segundo escenario, los linfocitos Th17 podrían participar en el inicio de la lesión, considerando que un factor disparador son las infecciones en garganta, iniciando la activación de clonas de linfocitos T debido al mimetismo molecular que existe entre la proteína M de *S. pyogenes* y la queratina 14, incluso de aquellas clonas que no deberían ser patogénicas. En este escenario, la población ILC CD123^{bajo} podría participar en el mantenimiento de las lesiones, debido a que la psoriasis es un proceso inflamatorio donde se incrementan las citocinas IL-1 β e IL-23 lo que favorecería su activación. Además, se sabe que en las lesiones hay generación de vasos sanguíneos donde SDF-1 podría funcionar como un agente angiogénico²⁰⁷ y también favorecería el reclutamiento de la población ILC CD123^{bajo}. El tercer escenario que consideramos es la participación simultanea de ambas poblaciones linfoides (Th17 e ILC CD123^{bajo}) así como una interacción entre ellas. Una posible interacción entre los linfocitos Th17 y la población ILC CD123^{bajo} sería a través de la IL-3. Este escenario podría estar apoyado de acuerdo a la evidencia que muestra la cooperación entre las células Th2 y las ILC2 en un modelo de alergia pulmonar²⁰⁸.

La mayoría de los tratamientos contra la psoriasis han mostrado gran efectividad sin embargo, en la clínica algunos pacientes no responden a cierto tipo de terapia con anticuerpos. Por lo tanto, consideramos que el estudio de estas poblaciones linfoides sería muy relevante ya que la determinación de sus características funcionales podría ser una gran herramienta para tomar una decisión sobre el tratamiento que deben recibir los pacientes. Los hallazgos de este trabajo revelan la plasticidad de los linfocitos Th17 y la existencia de potenciales contribuyentes en la psoriasis como la población ILC CD123^{bajo}. Esto podría llevar a reconsiderar los participantes así como el análisis de sus características funcionales en la psoriasis y en otros procesos inflamatorios crónicos.

Con nuestros resultados proponemos un modelo que adiciona componentes a lo reportado en psoriasis (Figura 25). En la dermis lesionada existe una mezcla de linfocitos Th17 con fenotipo convencional y patogénico. La interacción de la Enterotoxina-B de *S. aureus* con los linfocitos Th17 induce un perfil patogénico, generando la disminución de IL-17 y el incremento de IFN- γ , ROR γ t, T-bet y Runx1, revelando la plasticidad de estos linfocitos. La existencia de clonas de linfocitos T autorreactivas que reconocen autoantígenos y que expresen los V β 2,6 y 17, las haría susceptibles de interactuar con el SEB, lo que favorecería las características patogénicas y su proliferación. Este cambio fenotípico inducido por el SEB podría estar relacionado al desarrollo de lesiones psoriásicas más grandes, lo que explicaría la correlación entre la presencia del SEB y la severidad de la enfermedad. Con respecto a la parte innata, en la dermis lesionada se encuentran dos poblaciones de ILC denominadas como ILC CD123^{bajo} y las ILC clásicas CD127⁺. La población ILC CD123^{bajo} está incrementada en la dermis lesionada y puede producir IL-22 al igual que la población ILC CD127⁺. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales encontramos las células ILC CD123^{bajo} son capaces de producir IL-17, confiriéndoles la capacidad de participar en el proceso inflamatorio de la psoriasis. Se ha propuesto que tanto la respuesta inmune innata y adaptativa contribuyen cada una por separado al desarrollo de la psoriasis. Sin embargo, el incremento del SEB y de citocinas como IL-1 β e IL-23 reportado en los pacientes podría activar tanto a los linfocitos Th17 como a las poblaciones ILC, lo cual generaría la activación de ambas células linfoides en la piel de pacientes psoriasis.

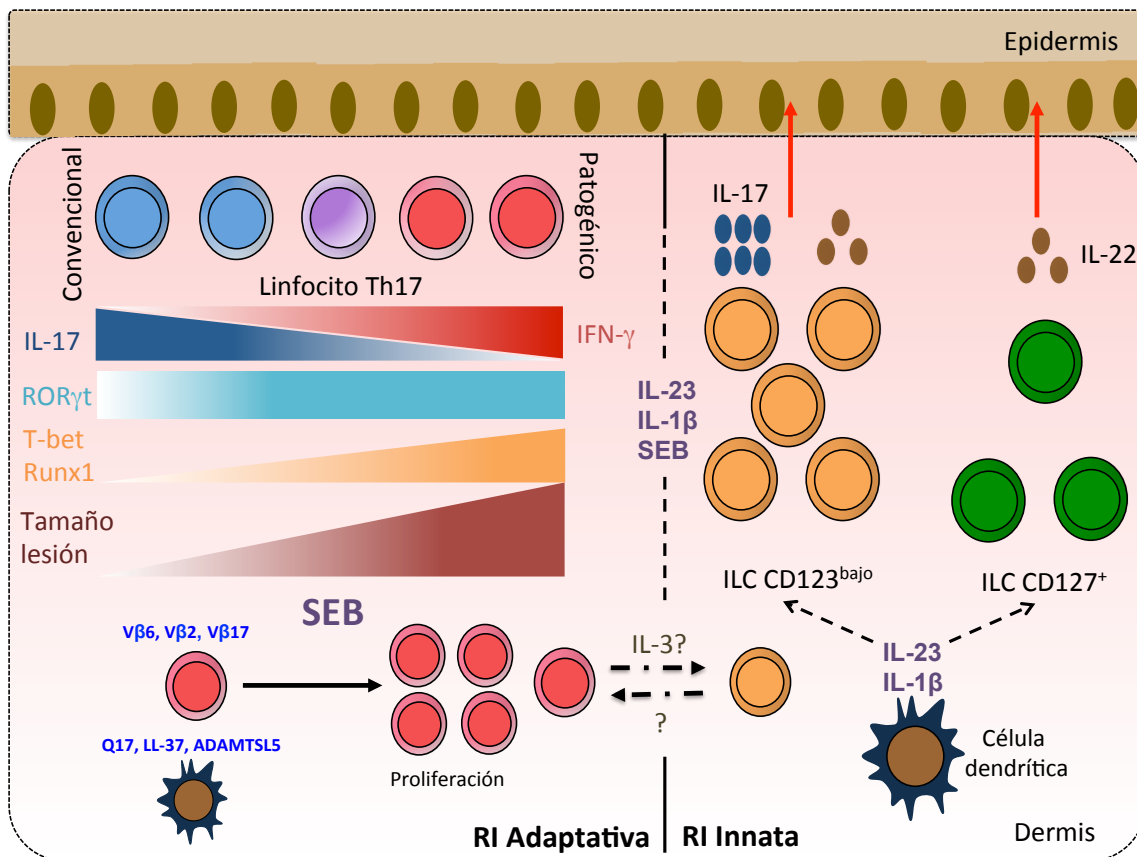


Figura 25. Los linfocitos Th17 patogénicos y la población ILC CD123^{bajo} como contribuyentes en la fisiopatología de la psoriasis. En dermis lesionada hay linfocitos Th17 con fenotipo convencional y patológico así como células ILC CD123^{bajo} e ILC CD127⁺. La presencia de SEB puede modificar el fenotipo y función de las células Th17. La presencia de clones que reconocen autoantígenos o clones que expresen los V β 2,6 y 17 (azul), podría favorecer el incremento de linfocitos Th17 en dermis lesionada. Con respecto a la parte innata, la población ILC CD123^{bajo} está incrementada así como su capacidad de producir IL-17. La psoriasis podría estar mediada por linfocitos innatos y adaptativos de manera independiente (línea negra continua). Sin embargo, el incremento de IL-1 β , IL-23 y SEB podría favorecer que ambas ramas linfoides se activen en la psoriasis (línea negra punteada). Queratina 17 (Q17). Catelicidina (LL-37). ADAMTSL5 (A desintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs like-protein 5)

VIII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Este trabajo revela el incremento de linfocitos Th17 en dermis lesionada y su gran capacidad de adquirir características patogénicas tales como la expresión de T-bet, Runx1, la expresión de IFN- γ y la pérdida de IL-17 generada por la estimulación con SEB. Además, las características patogénicas podrían estar contribuyendo en la generación de placas psoriásicas más grandes.

Nuestros resultados muestran que las células Th17 de dermis lesionada tienen una mayor plasticidad hacia el perfil patogénico ya que producen principalmente IFN- γ y muestran una alta capacidad proliferativa. Mientras que las células Th17 de sangre periférica muestran una menor plasticidad debido a que mantienen la expresión de IL-17 y muestran una proliferación mas discreta. Este trabajo sugiere que los linfocitos Th17 aislados de sangre periférica tienen plasticidad en respuesta a una estimulación vía TCR, debido a que incrementan la expresión de T-bet y producen IL-17 e IFN- γ . Además, las citocinas IL-1 β e IL-23 acentúan de manera considerable la plasticidad estas células.

La población con características de linfocitos innato -ILC CD123^{bajo}- que previamente describimos en dermis sana, también está presente en la dermis sin lesión e incrementada en la dermis lesionada de los pacientes. Además, bajo nuestras condiciones de estimulación, la población ILC CD123^{bajo} es capaz de producir IL-17. Encontramos que la población ILC CD123^{bajo} proveniente de dermis lesionada o dermis sin lesión no requiere de estimulación adicional para producir IL-17 e IL-22, confiriéndole un posible potencial de contribuir en la fisiopatología de la psoriasis.

Nuestro trabajo revela que la producción de IL-17 por las poblaciones linfoides adaptativas e innatas es un proceso dinámico. Demostramos que las células Th17 reducen su producción de IL-17 y que la población ILC CD123⁺ es productora de esta citocina. Por lo tanto, el estudio en conjunto de estas poblaciones linfoides sería de gran ayuda para conocer si los pacientes son candidatos para el uso de anticuerpos contra IL-17 o si requieren de otra terapia dirigida contra otras citocinas.

IX. PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

- Determinar la presencia de *S. aureus* y SEB en dermis LS y NLS así como su posible correlación con la severidad de la enfermedad.
- Evaluar la clonalidad de los linfocitos Th17 que responden a SEB en piel y sangre de pacientes con psoriasis.
- Determinar si la plasticidad fenotípica y funcional de los linfocitos Th17 también ocurre en sangre periférica de pacientes con psoriasis.
- Analizar la producción de IL-17, IL-22 e IFN- γ en las poblaciones ILC CD123^{bajo} e ILC CD127⁺ con estímulos adicionales.
- Analizar como se encuentran los mecanismos que regulan la función de las ILC en dermis LS y NLS.
- Definir el mecanismo de regulación epigenética y transcripcional de los linfocitos Th17 patogénicos y de las ILC CD123^{bajo}.
- Demostrar en un modelo animal la contribución de los linfocitos Th17 patogénicos y la población ILC CD123^{bajo} en la fisiopatología de la psoriasis.
- Evaluar si el fenotipo o función de los linfocitos Th17 o de la población ILC CD123^{bajo} puede ayudar en la elección de tratamiento para los pacientes con psoriasis.

X. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):496–509.
2. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):866–73.
3. Boehcke WH, Schön MP. Psoriasis. Seminar Psoriasis. *The Lancet*. 2015 Sep 5;386(9997):983–94.
4. Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2012 Feb 28;7(1):385–422.
5. Nast A, Boehcke W-H, Mrowietz U, Ockenfels H-M, Philipp S, Reich K, et al. S3 - Guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris. *J Dtsch Dermatol Gest*. 2012:S1–95.
6. Griffiths C, Barker J. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*. 2007 Jul 21;370(9583):263–71.
7. Alekseyenko AV, Perez-Perez GI, De Souza A, Strober B, Gao Z, Bihan M, et al. Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis. *Microbiome*. *BioMed Central*; 2013 Dec 23;1(1):31.
8. Tett A, Pasolli E, Farina S, Truong DT, Asnicar F, Zolfo M, et al. Unexplored diversity and strain-level structure of the skin microbiome associated with psoriasis. *Biofilms and Microbiomes*. Springer; 2017 Jun 13:1–11.
9. Marples RR, Heaton CL, Kligman AM. *Staphylococcus aureus* in psoriasis. *Arch Dermatol*. 1973 Apr;107(4):568–70.
10. Travers JB, Hamid QA, Norris DA, Kuhn C, Giorno RC, Schlievert PM, et al. Epidermal HLA-DR and the enhancement of cutaneous reactivity to superantigenic toxins in psoriasis. *J Clin Invest*. 1999 Nov;104(9):1181–9.
11. Balci DD, Duran N, Ozer B, Gunesacar R, Onlen Y, Yenil JZ. High prevalence of *Staphylococcus aureus* cultivation and superantigen production in patients with psoriasis. *Eur J Dermatol*. 2009 May;19(3):238–42.
12. Tomi NS, Kränke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *J Am Acad of Dermatol*. 2005 Jul;53(1):67–72.
13. Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet*. 2009 Feb;41(2):199–204.
14. Morizane S, Yamasaki K, Hleisen BMU, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, et al. Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 in Psoriasis Enables Keratinocyte Reactivity against TLR9 Ligands. *J Invest Dermatol*; 2011 Aug 18;132(1):135–43.
15. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med*. 2005 Jul 4;202(1):135–43.
16. Jaehwam K, Krueger JG. The Immunopathogenesis of Psoriasis. *Dermatologic Clinics*; 2015 Jan 1;33(1):13–23..

17. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of Psoriasis. *Annu Rev Immunol.* 2014 Mar 21;32(1):227–55.
18. Zaba LC, Suarez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Nograles KE, Emma Guttman-Yassky, et al. Effective treatment of psoriasis with etanercept is linked to suppression of IL-17 signaling, not immediate response TNF genes. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Nov 1;124(5):1022–395.
19. Ali T, Bronze, Kaitha, Mahmood, Ftasi, Stone. Clinical use of anti-TNF therapy and increased risk of infections. *DHPS.* 2013 Mar:79–21.
20. Leonardi CL, Kimball AB, Papp KA, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *The Lancet.* 2008 May;371(9625):1665–74.
21. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CEM, Papp K, et al. Secukinumab in Plaque Psoriasis - Results of Two Phase 3 Trials. *N Engl J Med.* 2014 Jul 24;371(4):326–38.
22. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol.* 1995 Dec 15;155(12):5483–6.
23. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Annu Rev Immunol.* 2007 Apr;25(1):821–52.
24. Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, et al. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem.* 2007 May 4;282(18):13447–55.
25. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor- β , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human Th-17 responses. *Nat Immunol.* 2008 May 4;9(6):650–7.
26. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009 Apr;27(1):485–517.
27. Toy D, Kugler D, Wolfson M, Bos TV, Gurgel J, Derry J, et al. Cutting Edge: Interleukin 17 Signals through a Heteromeric Receptor Complex. *J Immunol.* 2006 Jun 19;177(1):36–9.
28. Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K, et al. Identification of the IL-17 Receptor Related Molecule IL-17RC as the Receptor for IL-17F. *J Immunol.* 2007 Oct 2;179(8):5462–73.
29. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jul 3:1–13.
30. Brembilla NC, Senra L, Boehncke W-H. The IL-17 Family of Cytokines in Psoriasis: IL-17A and Beyond. *Front Immunol.* 2018 Aug 2;9:983–13.
31. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005 Oct 2;6(11):1133–41.

32. McGeachy MJ. GM-CSF: the secret weapon in the T(H)17 arsenal. *Nature Immunology*. 2011 Jun;12(6):521–2.
33. Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol*. 2011 Oct 1;23(5):613–9.
34. Malakouti M, Brown GE, Wang E, Koo J, Levin EC. The role of IL-17 in psoriasis. *J Dermatol Treat*. 2015 Feb 13;26(1):41–4.
35. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM, Cormane RH. Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res*. 1983;275(3):181–9.
36. Nikaein A, Phillips C, Gilbert SC, Savino D, Silverman A, Stone MJ, et al. Characterization. *J Invest Dermatol*. 1991 Jan 1;96(1):3–9.
37. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest*. 1994 Jul;94(1):202–9.
38. Heydendael VMR, Spuls PI, Opmeer BC, de Borgie CAJM, Reitsma JB, Goldschmidt WFM, et al. Methotrexate versus cyclosporine in moderate-to-severe chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med*. 2003 Aug 14;349(7):658–65.
39. Kanamori H, Tanaka M, Kawaguchi H, Yamaji S, Fujimaki K, Tomita N, et al. Resolution of psoriasis following allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: Case report and review of the literature. *Am J Hematol*. 2002 Sep 3;71(1):41–4.
40. Sigmundsdottir H, Sigurgeirsson B, Troye-Blomberg M, Good MF, Valdimarsson H, Jonsdottir I. Circulating T cells of patients with active psoriasis respond to streptococcal M-peptides sharing sequences with human epidermal keratins. *Scand J Immunol*. 1997 Jun;45(6):688–97.
41. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous Development of Psoriasis in a New Animal Model Shows an Essential Role for Resident T Cells and Tumor Necrosis Factor- α . *J Exp Med*. 2004 Mar 1;199(5):731–6.
42. Lande R, Botti E, Jandus C, Dojcinovic D, Fanelli G, Conrad C, et al. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nat Commun*. 2014 Dec 3;5:5621.
43. Arakawa A, Siewert K, Stöhr J, Besgen P, Kim S-M, Rühl G, et al. Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *J Exp Med*. 2015 Dec 14;212(13):2203–12.
44. Zhang L, Yang X-Q, Cheng J, Hui R-S, Gao T-W. Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3. *Clin Immunol*. 2010 Apr 1;135(1):108–17.
45. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FoxP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):119–30.
46. Kim J, Lee J, Gonzalez J, Fuentes-Duculan J, Garcet S, Krueger JG. Proportion of CD4+CD49b+LAG-3+ Type 1 Regulatory T Cells in the Blood of Psoriasis Patients Inversely Correlates with Psoriasis Area and Severity Index. *J Invest Dermatol*; 2018 Aug 16:1–4.

47. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13;421(6924):744–8.
48. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Oct 2;6(11):1123–32.
49. O'Connor W, Zenewicz LA, Flavell RA. The dual nature of TH17 cells: shifting the focus to function. *Nat Immunol*. 2010 May 18;11(6):471–6.
50. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*. 2006 Sep;126(6):1121–33.
51. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015 May 1;16(5):448–57.
52. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*. 2007 Jun 20;8(9):967–74.
53. Travis MA, Sheppard D. TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014 Mar 21;32(1):51–82.
54. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nat Cell Biol*. 2006 Apr 30;441(7090):231–4.
55. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179–89.
56. Ichiyama K, Sekiya T, Inoue N, Tamiya T, Kashiwagi I, Kimura A, et al. Transcription Factor Smad-Independent T Helper 17 Cell Induction by Transforming-Growth Factor- β ; Is Mediated by Suppression of Eomesodermin. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):741–54.
57. Tanaka S, Jiang Y, Martinez GJ, Tanaka K, Yan X, Kurosaki T, et al. Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells. *J Exp Med*. 2018 Jun 21;161:779–16.
58. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):57–63.
59. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature*. 2007 Jun 20;448(7152):484–7.
60. Coquet JM, Chakravarti S, Smyth MJ, Godfrey DI. Cutting Edge: IL-21 Is Not Essential for Th17 Differentiation or Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 2008 May 19;180(11):7097–101.
61. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 2007 Jun 20;448(7152):480–3.

62. Akdis M, Aab A, Altunbulaki C, Azkur K et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor b, and TNF-a: Receptors, functions, and roles in diseases. *J Aller Clin Immunol*. 2016 Oct 1;138(4):984–1010.
63. Teng MWL, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova J-L, Cooper AM, et al. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med*. 2015 Jun 29;21(7):719–29.
64. Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, et al. Interleukin-23 Restrains Regulatory T Cell Activity to Drive T Cell-Dependent Colitis. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):559–70.
65. Eberl G, Littman DR. The role of the nuclear hormone receptor RORgamma t in the development of lymph nodes and Peyer's patches. *Immunol Rev*. 2003 Oct;195:81–90.
66. Jetten AM. Recent advances in the mechanisms of action and physiological functions of the retinoid-related orphan receptors (RORs). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004 Dec;3(4):395–412.
67. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, et al. T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . *Immunity*. 2008 Jan;28(1):29–39.
68. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):477–87.
69. Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, et al. Diverse Targets of the Transcription Factor STAT3 Contribute to T Cell Pathogenicity and Homeostasis. *Immunity*; 2010 May 28;32(5):605–15.
70. Collins A, Littman DR, Taniuchi I. RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice. *Nat Rev Immunol*. 2009 Feb;9(2):106–15.
71. Zhang F, Meng G, Strober W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17–producing T cells. *Nat Immunol*. 2008 Oct 12;9(11):1297–306.
72. Julliard W, Fechner JH, Mezrich JD. The Aryl Hydrocarbon Receptor Meets Immunology: Friend or Foe? A Little of Both. *Front Immunol*. 2014 Oct 2;5(12):3–7.
73. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, et al. Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2008 Mar 23;453(7191):65–71.
74. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld J-C, et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*. 2008 Mar 23;453(7191):106–9.
75. Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2009 Apr;21(2):146–52.
76. Lohoff M, Mittrücker H-W, Prechtel S, Bischof S, Sommer F, Kock S, et al. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Sep 3;99(18):11808–12.

77. Brüstle A, Heink S, Huber M, Rosenplänter C, Stadelmann C, Yu P, et al. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):958–66.
78. Schraml BU, Hildner K, Ise W, Lee W-L, Smith WAE, Solomon B, et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature.* 2009 Jul 16;460(7253):405–9.
79. Kopp T, Lenz P, Bello-Fernandez C, Kastelein RA, Kupper TS, Stingl G. IL-23 Production by Cosecretion of Endogenous p19 and Transgenic p40 in Keratin 14/p40 Transgenic Mice: Evidence for Enhanced Cutaneous Immunity. *J Immunol.* 2003 Jun 1;170(11):5438–44.
80. Chan JR, Blumenschein W, Murphy E, Diveu C, Wiekowski M, Abbondanzo S, et al. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2–dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med.* 2006 Nov 27;203(12):2577–87.
81. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, Pittman D, Wang F, Chamian F, et al. Increased Expression of Interleukin 23 p19 and p40 in Lesional Skin of Patients with Psoriasis Vulgaris. *J Exp Med.* 2004 Jan 5;199(1):125–30.
82. Teunissen MBM, Bos JD, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA. Interleukin-17 and Interferon-gamma Synergize in the Enhancement of Proinflammatory Cytokine Production by Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998 Jan 1;111(4):645–9.
83. 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 Mar 19;129(9):2175–83.
84. Hedrick MN, Lonsdorf AS, Shirakawa A-K, Richard Lee C-C, Liao F, Singh SP, et al. CCR6 is required for IL-23-induced psoriasis-like inflammation in mice. *J Clin Invest.* 2009 Aug;119(8):2317–29.
85. Fujishima S, Watanabe H, Kawaguchi M, Suzuki T, Matsukura S, Homma T, et al. Involvement of IL-17F via the induction of IL-6 in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2010 Feb 11;302(7):499–505.
86. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):950–7.
87. Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, as MSAR-FN, Nograles KE, Tian S, Cardinale I, et al. Integrative Responses to IL-17 and TNF- α ; in Human Keratinocytes Account for Key Inflammatory Pathogenic Circuits in Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2010 Nov 18;131(3):677–87.
88. Ma H-L, Napierata L, Stedman N, Benoit S, Collins M, Nickerson-Nutter C, et al. Tumor necrosis factor α blockade exacerbates murine psoriasis-like disease by enhancing Th17 function and decreasing expansion of Treg cells. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):430–40.

- 89.** Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggle K, Anderson M, et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN- γ are not. *J Mol Med*. 2009 Mar 30;87(5):523–36.
- 90.** Ma H-L, 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 Jan 17.
- 91.** Rizzo HL, Kagami S, Phillips KG, Kurtz SE, Jacques SL, Blauvelt A. IL-23-mediated psoriasis-like epidermal hyperplasia is dependent on IL-17A. *J Immunol*; 2011 Feb 1;186(3):1495–502.
- 92.** Nishimoto S, Kotani H, Tsuruta S, Shimizu N, Ito M, Shichita T, et al. Th17 Cells Carrying TCR Recognizing Epidermal Autoantigen Induce Psoriasis-like Skin Inflammation. *J Immunol*. 2013 Sep 6;191(6):3065–72.
- 93.** Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, et al. Psoriasis Vulgaris Lesions Contain Discrete Populations of Th1 and Th17 T Cells. *J Investig Dermatol*. 2008 Jan 17;128(5):1207–11.
- 94.** Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Investig Dermatol*. 2010 May;130(5):1373–83.
- 95.** Luan L, Ding Y, Han S, Zhang Z, Liu X. An increased proportion of circulating Th22 and Tc22 cells in psoriasis. *Cell Immunol*. 2014 Aug;290(2):196–200.
- 96.** Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and “inflammatory” dendritic cells in human skin. *J Investig Dermatol*. 2009 Feb;129(2):302–8.
- 97.** Mehta NN, Dagur PK, Rose SM, Naik HB, Stansky E, Doveikis J, et al. IL-17A Production in Human Psoriatic Blood and Lesions by CD146 T Cells. *J Investig Dermatol*. 2014 Aug 21;135(1):311–4.
- 98.** Usui T, Nishikomori R, Kitani A, Strober W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12R β 2 chain or T-bet. *Immunity*. 2003 Mar;18(3):415–28.
- 99.** O’Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 2010 Feb 26;327(5969):1098–102.
- 100.** McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):445–53.
- 101.** Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*. 2007 Feb;13(2):139–45.
- 102.** Qi H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol*. 2016 Aug 30;16(10):612–25.
- 103.** Chen Z, Tato CM, Muul L, Laurence A, O’Shea JJ. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum*. 2007 Sep;56(9):2936–46.
- 104.** Gagliani N, Vesely MCA, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*. 2015 Apr 29;523(7559):221–5.

- 105.** Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2011 Jan 30;12(3):255–63.
- 106.** Annunziato F, Cosmi L, Santarasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1849–61.
- 107.** Reinert-Hartwall L, Honkanen J, Salo HM, Nieminen JK, Luopajarvi K, Hrknen T, et al. Th1/Th17 Plasticity Is a Marker of Advanced Cell Autoimmunity and Impaired Glucose Tolerance in Humans. *J Immunol.* 2014 Dec 19;194(1):68–75.
- 108.** Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon- γ -expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2009 Sep;66(3):390–402.
- 109.** Cosmi L, De Palma R, Santarasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161⁺ CD4⁺ T cell precursor. *J Exp Med.* 2008 Aug 4;205(8):1903–16.
- 110.** Wei G, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, Yao Z, et al. Global Mapping of H3K4me3 and H3K27me3 Reveals Specificity and Plasticity in Lineage Fate Determination of Differentiating CD4⁺ T Cells. *Immunity.* 2009 Jan 16;30(1):155–67.
- 111.** Ghoreschi K, Laurence A, Yang X-P, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature.* 2010 Oct 11;467(7318):967–71.
- 112.** Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity.* 2009 Jan 16;30(1):92–107.
- 113.** Mukasa R, Balasubramani A, Lee YK, Whitley SK, Weaver BT, Shibata Y, et al. Epigenetic Instability of Cytokine and Transcription Factor Gene Loci Underlies Plasticity of the T Helper 17 Cell Lineage. *Immunity.* 2010 May 28;32(5):616–27.
- 114.** Stadhouders R, Lubberts E, Hendriks RW. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2018 Feb;87:1–15.
- 115.** Lazarevic V, Chen X, Shim J-H, Hwang E-S, Jang E, Bolm AN, et al. T-bet represses T. *Nat Immunol.* 2010 Dec 12;12(1):96–104.
- 116.** Wang Y, Godec J, Ben-Aissa K, Cui K, Zhao K, Pucsek AB, et al. The Transcription Factors T-bet and Runx Are Required for the Ontogeny of Pathogenic Interferon-gamma Producing T Helper 17 Cells. *Immunity.* 2014 Mar 20;40(3):355–66.
- 117.** Harbour SN, Maynard CL, Zindl CL, Schoeb TR, Weaver CT. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc Natl Acad Sci.* 2015 Jun 2;112(22):7061–6.
- 118.** Langrish CL. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005 Jan 18;201(2):233–40.
- 119.** Bending D, La Peña De H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, et al. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest.* 2009 Mar 2;119(3):565–72.

- 120.** Ahlfors H, Morrison PJ, Duarte JH, Li Y, Biro J, Tolaini M, et al. IL-22 Fate Reporter Reveals Origin and Control of IL-22 Production in Homeostasis and Infection. *J Immunol*. 2014 Oct 17;193(9):4602–13.
- 121.** Morrison PJ, Bending D, Fouser LA, Wright JF, Stockinger B, Cooke A, et al. Th17-cell plasticity in *Helicobacter hepaticus* induced intestinal inflammation. *Muc Immunol*. 2013 Mar 6;474:298.
- 122.** Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature*. 2012 Apr 18;484(7395):514–8.
- 123.** Peters A, Lee Y, Kuchroo VK. The many faces of Th17 cells. *Curr Opin Immunol*. 2011 Dec 1;23(6):702–6.
- 124.** Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*. 2012 Sep 9;13(10):991–9.
- 125.** Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Querci V, Beltrame L, Cavalieri D, et al. Rarity of Human T Helper 17 Cells Is due to Retinoic Acid Orphan Receptor-Dependent Mechanisms that Limit Their Expansion. *Immunity*. 2012 Feb 24;36(2):201–14.
- 126.** Santarlasci V, Maggi L, Mazzoni A, Capone M, Querci V, Rossi MC, et al. IL-4-induced gene 1 maintains high Tob1 expression that contributes to TCR unresponsiveness in human T helper 17 cells. *Eur J Immunol*. 2013 Dec 27;44(3):654–61.
- 127.** Basdeo SA, Cluxton D, Sulaimani J, Moran B, Canavan M, Orr C, et al. Ex-Th17 (Nonclassical Th1) Cells Are Functionally Distinct from Classical Th1 and Th17 Cells and Are Not Constrained by Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2017 Mar 6;198(6):2249–59.
- 128.** Gaublomme JT, Yosef N, Lee Y, Gertner RS, Yang LV, Wu C, et al. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell*. 2015 Dec 3;163(6):1400–12.
- 129.** Hazenberg MD, Spits H. Human innate lymphoid cells. *Blood*. 2014 Jul 31;124(5):700–9.
- 130.** 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 Oct 4;17(2):436–47.
- 131.** Zook EC, Kee BL. Development of innate lymphoid cells. *Nat Immunol*. 2016 Jun 21;17(7):775–82.
- 132.** Gronke K, Kofoed-Nielsen M, Diefenbach A. *Immunol Letters*. 2016 Nov 1;179:9–18.
- 133.** 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 May 17;44(5):1140–50.

- 134.** 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 Feb 1;13(2):145–9.
- 135.** Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell.* 2018 Aug 23;174(5):1054–66.
- 136.** Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer.* 1975 Aug 15;16(2):230–9.
- 137.** Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. “Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol.* 1975 Feb;5(2):117–21.
- 138.** Cortez V, Colonna M. Diversity and function of group 1 innate lymphoid cells. *Immunol Letters.* 2016 Jul 6;:1–31.
- 139.** 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 Oct 19;37(4):649–59.
- 140.** Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Rev Immunol;* 2013 Jun 1;14(6):536–42.
- 141.** Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, et al. Identification of an interleukin IL-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med.* 2006 Apr 17;203(4):1105–16.
- 142.** Doherty TA. At the Bench: Understanding group 2 innate lymphoid cells in disease. *J Leu Biol.* 2015 Mar 2;97(3):455–67.
- 143.** Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CGK, Doering TA, et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol.* 2011 Sep 25;12(11):1045–54.
- 144.** Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science.* 2015 May 21;348(6237):6566–6.
- 145.** Mjosberg J, Spits H. Human innate lymphoid cells. *J Aller Clin Immunol.* 2016 Nov 1;138(5):1265–76.
- 146.** Colonna M. Innate Lymphoid Cells: Diversity, Plasticity, and Unique Functions in Immunity. *Immunity.* 2018 Jun 19;48(6):1104–17.
- 147.** Satoh-Takayama N, Vosshenrich CAJ, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, et al. Microbial Flora Drives Interleukin 22 Production in Intestinal NKp46. *Immunity.* 2008 Dec 19;29(6):958–70.
- 148.** Hepworth MR, Sonnenberg GF. Regulation of the adaptive immune system by innate lymphoid cells. *Curr Opi Immunol.* 2014 Apr 1;27:75–82.
- 149.** Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol.* 2003 Apr;3(4):292–303.
- 150.** Bar-Ephraïm YE, Mebius RE. Innate lymphoid cells in secondary lymphoid organs. *Immunol Rev.* 2016 May;271(1):185–99.
- 151.** Cording S, Medvedovic J, Aychek T, Eberl G. Innate lymphoid cells in defense, immunopathology and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2016 Jul 1;17(7):755–7.

- 152.** Bernink JH, Peters CP, Munneke M, Velde te AA, Meijer SL, Weijer K, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol.* 2013 Jan 20;14(3):221–9.
- 153.** 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 Feb 19;196(5):2051–62.
- 154.** O’Sullivan TE, Rapp M, Fan X, Weizman O-E, Bhardwaj P, Adams NM, et al. Adipose-Resident Group 1 Innate Lymphoid Cells Promote Obesity-Associated Insulin Resistance. *Immunity.* 2016 Aug 16;45(2):428–41.
- 155.** Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat. Med* 2015 Jun 29;21(7):698–708.
- 156.** Peebles RS. At the Bedside: The emergence of group 2 innate lymphoid cells in human disease. *J Leu Biol.* 2015 Mar 2;97(3):469–75.
- 157.** Barlow J, Bellosi A, Hardman C, Drynan L, Cruickshank JP, et al. Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Jan 1;129(1):191–4.
- 158.** Lao-araya M, Steveling E, Scaddin G, Durham S, Samji H. Seasonal increases in peripheral innate lymphoid type 2 cells are inhibited by subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Nov 1;134(5):1193–4.
- 159.** Roediger B, Kyle R, Yip KH, Sumaria N, Guy TV, Kim BS, et al. Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 2013 Jun;14(6):564–73.
- 160.** Ebbo M, Crinier A, Vély F, Vivier E. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2017 Aug 14:1–14.
- 161.** Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, et al. *Nature.* 2010 Apr 20;464(7293):1371–5.
- 162.** Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F, et al. IL-1 mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4+ Th17 cells. *J Exp Med.* 2012 Aug 27;209(9):1595–609.
- 163.** Kim HY, Lee HJ, Chang Y-J, Pichavant M, Shore SA, Fitzgerald KA, et al. Interleukin-17 producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med.* 2013 Dec 15;20(1):54–61.
- 164.** Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV, Fleming MPP, Rust N, Singh B, Mortensen NJ, et al. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J Exp Med.* 2011 Jun 6;208(6):1127–33.
- 165.** Cols M, Rahman A, Maglione P, Garcia-Carmona Y, Simchoni N, Hual-Bin M, et al. Expansion of inflammatory innate lymphoid cells in patients with common variable immune deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Apr 1;137(4):1206–6.
- 166.** Leijten EFA, van Kempen TS, Boes M, Michels-van Amelsfort JMR, Hijnen D, Hartgring SAY, et al. Enrichment of Activated Group 3 Innate Lymphoid Cells in Psoriatic Arthritis Synovial Fluid. *Arthr Rheumatol.* 2015 Sep 23;67(10):2673–8.

- 167.** Pantelyushin S, Haak S, Ingold B, Kulig P, Heppner FL, Navarini AA, et al. Ror γ t⁺ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J Clin Invest*. 2012 Jun;122(6):2252–6.
- 168.** Dyring-Andersen B, Geisler C, Agerbeck C, Lauritsen JPH, Gúdjonsdóttir SD, Skov L, et al. Increased number and frequency of group 3 innate lymphoid cells in nonlesional psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 2014 Mar 12;170(3):609–16.
- 169.** Villanova F, Flutter B, Tosi I, Gryns 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 Mar 12;134(4):984–91.
- 170.** Teunissen MBM, Munneke JM, Bernink JH, Spuls PI, Res PCM, Velde te A, et al. Composition of Innate Lymphoid Cell Subsets in the Human Skin: Enrichment of NCR. *J Invest Dermatol*; 2014 Apr 23;:1–10.
- 171.** Vély F, Barlogis V, Vallentin B, Neven B, Piperoglou C, Ebbo M, et al. Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nat Immunol*. 2016 Sep 12;17(11):1291–9.
- 172.** 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 Aug 17;16(10):1044–50.
- 173.** 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 Reports*. The Authors; 2015 Mar 31;10(12):2043–54.
- 174.** Cowell IG. E4BP4/NFIL3, a PAR-related bZIP factor with many roles. *Bioessays*. 2002 Oct 17;24(11):1023–9.
- 175.** Mora-Velandia LM, Castro-Escamilla O, Méndez AG, Aguilar-Flores C, Velázquez-Avila M, Tussié-Luna MI, et al. A Human Lin[–] CD123⁺ CD127^{low} Population Endowed with ILC Features and Migratory Capabilities Contributes to Immunopathological Hallmarks of Psoriasis. *Front Immunol*. 2017 Mar 2;8(6):647.
- 176.** Lim AI, Li Y, Lopez-Lastra S, Stadhouders R, Paul F, Casrouge A, et al. Systemic Human ILC Precursors Provide a Substrate for Tissue ILC Differentiation. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):1086–1100.e10.
- 177.** Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):337–48.
- 178.** Wilhelm C, Turner J-E, Van Snick J, Stockinger B. The many lives of IL-9: a question of survival *Nat Immunol*. 2012 Jun 19;13(7):637–41.
- 179.** Pietrzak AT, Zalewska A, Chodorowska G, Krasowska D, Michalak-Stoma A, Nockowski P, et al. Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin Chim Acta*. 2008 Aug;394(1-2):7–21.
- 180.** Stockinger B, Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat. Rev. Immunol*. 2017 May 30:1–10.
- 181.** Assenmacher M, Löhning M, Scheffold A, Manz RA, Schmitz J, Radbruch A. Sequential production of IL-2, IFN-gamma and IL-10 by individual staphylococcal enterotoxin B-activated T helper lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1998 May;28(5):1534–43.

- 182.** Kryczek I, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Aphale A, Vatan L, et al. Induction of IL-17+ T Cell Trafficking and Development by IFN-gamma : Mechanism and Pathological Relevance in Psoriasis. *J Immunol.* 2008 Sep 18;181(7):4733–41.
- 183.** Bour H, Puisieux I, Even J, Kourilsky P, Favrot M, Musette P, et al. T-cell repertoire analysis in chronic plaque psoriasis suggests an antigen-specific immune response. *Hum Immunol.* 1999 Aug;60(8):665–76.
- 184.** Ahangari G, Halapi E, Tehrani MJ, Fransson J, Hammar H, Wigzell H. RT-PCR topography of chronic psoriasis skin based on analysis of T-cell receptor B variable region gene usage. *Scand J Immunol.* 1997 May;45(5):534–40.
- 185.** Bohach GA. Staphylococcal Enterotoxins B and C. *Prep Biochem Biotech.* 1997 May;27(2-3):79–110.
- 186.** Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev.* 2008 Oct;225(1):226–43.
- 187.** Maggi L, Cimaz R, Capone M, Santarlaschi V, Querci V, Simonini G, et al. Brief Report: Etanercept Inhibits the Tumor Necrosis Factor α -Driven Shift of Th17 Lymphocytes Toward a Nonclassic Th1 Phenotype in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arth Rheumatol.* 2014 Apr 28;66(5):1372–7.
- 188.** Goswami R, Kaplan MH. A Brief History of IL-9. *J Immunol.* 2011 Mar 2;186(6):3283–8.
- 189.** Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, Dardalhon V, Awasthi A, Imitola J, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Nat Acad Sci.* 2009 Aug 4;106(31):12885–90.
- 190.** Rauber S, Luber M, Weber S, Maul L, Soare A, Wohlfahrt T, et al. Resolution of inflammation by interleukin-9-producing type 2 innate lymphoid cells. *Nat Med.* 2017 Jul 17:1–10.
- 191.** Travis MA, Sheppard D. TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014 Mar 21;32(1):51–82.
- 192.** Park CO, Kupper TS. The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. *Nat Med.* 2015 Jun 29;21(7):688–97.
- 193.** Matos TR, O'Malley JT, Lowry EL, Hamm D, Kirsch IR, Robins HS, et al. Clinically resolved psoriatic lesions contain psoriasis-specific IL-17–producing $\alpha\beta$ T cell clones. *J Clin Invest.* 2017 Sep 25:1–11.
- 194.** Heink S, Yogev N, Garbers C, Herwerth M, Aly L, Gasperi C, et al. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol.* 2016 Nov 28;18(1):74–85.
- 195.** Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* 2012 Oct 12;151(2):289–303.
- 196.** Eberl G, Di Santo JP, Vivier E. The brave new world of innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 2015 Jan 1;16(1):1–5.
- 197.** Zraggen S, Huggenberger R, Kerl K, Detmar M. An Important Role of the SDF-1/CXCR4 Axis in Chronic Skin Inflammation. *Plos One.* 2014 Apr 2;9(4):e93665.

- 198.** Geijsen N, Koenderman L, Coffers PJ. Specificity in cytokine signal transduction: lessons learned from the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cyto Growth Fact Rev.* 2001 Mar;12(1):19–25.
- 199.** Broughton SE, Dhagat U, Hercus TR, Nero TL, Grimbaldston MA, Bonder CS, et al. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunol Rev.* 2012 Nov;250(1):277–302.
- 200.** Bando JK, Gilfillan S, Song C, McDonald KG, Huang SCC, Newberry RD, et al. The Tumor Necrosis Factor Superfamily Member RANKL Suppresses Effector Cytokine Production in Group 3 Innate Lymphoid Cells. *Immunity.* 2018 May 23:1–17.
- 201.** Jadon DR, Nightingale AL, McHugh NJ, Lindsay MA, Korendowych E, Sengupta R. Serum Soluble Bone Turnover Biomarkers in Psoriatic Arthritis and Psoriatic Spondyloarthritis. *J Rheumatol.* 2015 Jan 1;42(1):21–30.
- 202.** Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins. Molecular Diversity Preservation International;* 2010 Aug;2(8):2177–97.
- 203.** Li K, Huang CC, Randazzo B, Li S, Szapary P, Curran M, et al. HLA-C*06:02 Allele and Response to IL-12/23 Inhibition: Results from the Ustekinumab Phase 3 Psoriasis Program. *J Invest Dermatol.* 2016 Dec 1;136(12):2364–71.
- 204.** Papp KA, Blauvelt A, Bukhalo M, Gooderham M, Krueger JG, Lacour J-P, et al. Risankizumab versus Ustekinumab for Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med.* 2017 Apr 20;376(16):1551–60.
- 205.** Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E, et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med.* 2012 Mar 29;366(13):1190–9.
- 206.** Keijsers RRM, Hendriks AGM, van Erp PEJ, van Cranenbroek B, van de Kerkhof PCM, Koenen HJPM, et al. In Vivo Induction of Cutaneous Inflammation Results in the Accumulation of Extracellular Trap-Forming Neutrophils Expressing ROR. *J Invest Dermatol.* 2014 Jan 1;134(5):1276–84.
- 207.** Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trend Immunol.* 2004 Apr;25(4):201–9.
- 208.** Mirchandani AS, Besnard A-G, Yip E, Scott C, Bain CC, Cerovic V, et al. Type 2 innate lymphoid cells drive CD4+ Th2 cell responses. *J Immunol.* 2014 Mar 1;192(5):2442–8.

XI. ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1.

Tabla 1. Datos demográficos de los pacientes con psoriasis

Paciente	Datos personales		PASI	Tiempo de evolución (años/meses)	Tamaño de la placa	Comorbilidades	Tratamiento previo con esteroides
	Sexo	Edad					
1	Femenino	50	9.4	23	Grande	Ob	No
2	Masculino	31	9.8	4	Grande	Ninguna	Si
3	Femenino	77	3.7	0.4	Grande	DM	No
4	Masculino	42	4.9	28	Pequeña	Ninguna	No
5	Masculino	26	4.2	1	Pequeña	Ninguna	No
6	Masculino	57	4.9	53	Pequeña	Ob	No
7	Masculino	39	3.1	15	Pequeña	Ninguna	No
8	Femenino	55	3.1	25	Grande	DM	No
9	Masculino	43	6.1	11	Grande	Ninguna	Si
10	Masculino	40	6.3	1	Grande	Ob	No
11	Masculino	39	6.3	10	Grande	Ob	Si
12	Femenino	44	6.6	3	Grande	Ob, DM	No
13	Masculino	36	5.2	4	Pequeña	Ninguna	No
14	Masculino	52	9.1	12	Grande	Ninguna	No
15	Femenino	30	5.7	4	Pequeña	Ninguna	Si
16	Masculino	68	5.4	5	Grande	DM, Dis	No
17	Masculino	51	5.2	26	Grande	Ninguna	Si
18	Masculino	44	5.4	6	Grande	Dis	Si
19	Femenino	45	2.1	1	Pequeña	Ninguna	Si
20	Masculino	20	9.6	5	Pequeña	Ninguna	No
21	Masculino	60	7.8	1	Grande	Ninguna	Si
22	Masculino	56	8.4	29	Grande	Ninguna	No
23	Masculino	55	17.8	20	Grande	Ob	No
24	Masculino	44	28.1	1	Grande	Ob	No
25	Femenino	49	20.4	14	Grande	DM, Dis	No
26	Masculino	44	10.4	4	Grande	Ninguna	No
27	Masculino	48	18.5	1	Grande	Ob	No
28	Femenino	67	12.3	32	Grande	DM	No
29	Femenino	66	10.8	5	Grande	DM	No
30	Masculino	31	12.5	1	Grande	Ninguna	Si
31	Femenino	37	10.4	10	Grande	Ninguna	Si
32	Masculino	60	33.3	9	Grande	Dis	Si
33	Masculino	31	11.9	5	Grande	Ninguna	No
34	Masculino	52	23	27	Grande	Ninguna	Si
35	Masculino	31	14.8	11	Pequeña	Ninguna	Si
36	Masculino	32	15.7	3	Grande	Ninguna	Si
37	Masculino	70	10.3	20	Grande	Ninguna	No
38	Masculino	42	14.1	14	Grande	Ob	No
39	Femenino	36	11.3	0.5	Grande	Ninguna	No
40	Femenino	80	6.6	5	Grande	Ninguna	Si
41	Femenino	39	20	2	Grande	Ninguna	No
42	Femenino	46	15	1	Grande	Ninguna	No
43	Femenino	59	24.8	1	Grande	DM	Si
44	Masculino	46	18	0.3	Grande	Ninguna	No
45	Femenino	45	3	10	Pequeña	Ob	No
46	Masculino	59	8	15	Grande	Ninguna	No
47	Femenino	37	1	3	Grande	Ob	No
48	Masculino	60	5.3	0.4	Grande	DM	Si
49	Masculino	63	5.3	3	Grande	Ninguna	No
50	Femenino	24	2.9	1	Grande	Ninguna	No
51	Masculino	37	3.1	0.2	Grande	Ob, DM	Si
52	Masculino	82	13	0.3	Grande	Dis	Si

Ob: Obesidad, DM: Diabetes Mellitus, Dis: Dislipidemia

Anexo 2. Estrategia para el aislamiento de linfocitos Th17

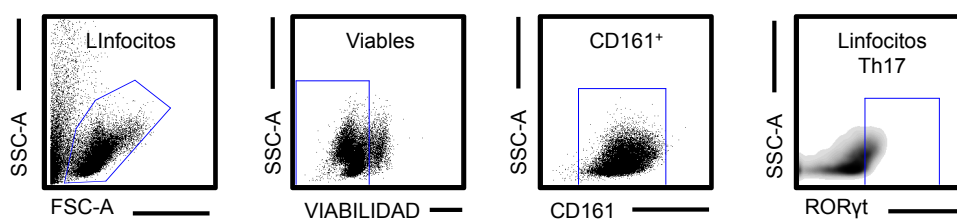


Figura suplementaria 1. Linfocitos Th17 purificados de sangre periférica de pacientes con psoriasis. Se muestra la estrategia de análisis realizada durante la purificación mediante citometría de flujo. Primero se seleccionaron los eventos correspondientes al tamaño y complejidad linfoide. Posteriormente se evaluó la viabilidad con FixAqua, después se seleccionaron las células CD161⁺ y finalmente mediante la expresión de RORyt se identificaron a los linfocitos Th17.

Anexo 3. Anticuerpos utilizados contra moléculas extracelulares e intracelulares.

Molécula	Fluorocromo	Clona	Dilución	Marca
CD3	PE	UCHT1	1:100	Biologend
CD14	PE	63D3	1:100	Biologend
CD19	PE	4G7	1:100	Biologend
CD94	PE	DX22	1:100	Biologend
HLA-DR	PE	L243	1:50	Biologend
CD123	PECy5	6H6	1:30	Biologend
CD127	Brilliant Violet 421	A019D5	1:20	Biologend
CD4	APCCy7	RPA-T4	1:100	BD Pharmingen
CD161	PE	HP-3G10	1:80	Biologend
RORyt	APC	AFKJS-9	1:20	Invitrogen
T-bet	PERCP/Cy5.5	4B10	1:100	Biologend
Runx-1	PE	RXDMC	1:50	Invitrogen
AhR	eFluor 660	FF3399	1:50	Invitrogen
IL-17	FITC	eBio64DEC17	1:20	Invitrogen
IL-22	eFluor 660	22URTI	1:20	Invitrogen
IFN- γ	PECy7	4S.B3	1:20	Biologend

Anexo 4. Anticuerpos utilizados para las tinciones de inmunofluorescencia.

Molécula	Especie	Fluorocromo	clona	Dilución	Marca
CD4	Conejo		Policlonal	1:100	Sigma
IFN- γ	Ratón		MD-1	1:80	Biologend
IL-17	Cabra		Policlonal	1:100	R&D Systems
Anti-Ratón	Burro	Alexa Fluor 647	Policlonal	1:200	Jackson ImmunoResearch
Anti-Cabra	Burro	Biotina	Policlonal	1:80	Jackson ImmunoResearch
Estreptavidina		Rojo Texas		1:100	Jackson ImmunoResearch

Anexo 5. Cartas de consentimiento informado.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(ADULTOS)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio: "Caracterización de Linfocitos Th17 patogénicos en pacientes con psoriasis y su posible asociación con la gravedad de la enfermedad"

Lugar y fecha: _____

Número de registro:

Justificación y objetivo del estudio: El estudio servirá para evaluar las características de algunas células que están presentes en las lesiones de piel y en la sangre de los pacientes y de esa manera tener un mejor conocimiento de la enfermedad.

Procedimientos: Le pediremos que asista a una visita, en la cual se le tomará una muestra de sangre y se le realizará una biopsia de piel con lesiones de psoriasis. El término biopsia se refiere a la toma de una parte de tejido u órgano, en este caso será un fragmento de su piel afectada por una lesión psoriásica. El sitio de la biopsia será definido entre usted y el médico, ya que al ser un procedimiento que deja cicatriz, usted podría preferir que se realice en zonas no visibles. Para toma de biopsia, se hace un aseo del área, se pone un punto de anestesia con xilocaína simple (si usted no es alérgico a la anestesia) y con un bisturí se tomará el fragmento de piel de un centímetro (semejante al largo de la uña del dedo pulgar). Para cerrar la herida se colocarán 3 puntos con material no absorbible por lo que debe acudir a retiro de puntos en 8 días. Es un procedimiento seguro que tomará de 15 a 20 minutos. Adicionalmente a estos procedimientos se le pedirá que responda algunas preguntas, por ejemplo: su edad, sexo, peso, talla, el tiempo que lleva enfermo (a), etc. Este cuestionario tomará aproximadamente de 10 a 15 minutos.

Posibles riesgos y molestias: Las molestias que se producen durante la toma de muestra de sangre son mínimas; pero se puede ocasionar un poco de dolor o una discreta molestia, y es posible que se le pueda formar un moretón. En cuanto a la biopsia es probable que presente dolor y/o ardor al momento de aplicar la anestesia, algunas molestias durante el procedimiento y como se comentó anteriormente este procedimiento deja una cicatriz permanente en el sitio. El sitio de la biopsia puede presentar dolor o incomodidad una vez que haya pasado el efecto de la anestesia. Deberá seguir las indicaciones del médico del estudio en cuanto al cuidado de la herida para evitar cualquier complicación posterior, como pudieran ser ruptura de puntos o infecciones.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio: El protocolo está destinado a generar conocimiento que ayude al entendimiento de la enfermedad, sin embargo usted no tendrá un beneficio directo.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento: Se le proporcionarán los resultados del estudio si usted lo solicita.

Participación o retiro: Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio no modificará de ninguna manera la atención médica que se le brinda. Usted puede hacer las preguntas que desee al inicio o a lo largo del estudio a las personas encargadas de éste.

Privacidad y confidencialidad: La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla/o (como su nombre, teléfono, dirección, etc.) será guardada de manera confidencial y por separado, al igual que sus respuestas a los cuestionarios y los resultados de sus pruebas clínicas, todo esto con la finalidad de garantizar su privacidad. Además se le asignará un número el cual será utilizado para identificarlo a lo largo del estudio manteniendo la privacidad de sus datos personales. Las muestras y células obtenidas a partir de ellas no se usarán para extracción de material genético ni para la generación de líneas celulares inmortalizadas. En caso de que algún resultado obtenido sugiriera que podría ser de importancia realizar estudios genéticos se le informará y se tomará un nuevo consentimiento informado, el cual estará usted en completa libertad de aceptar o rechazar.

En caso de colección de material biológico:

Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.
 No autoriza que se tome la muestra.

Beneficios al término del estudio: El beneficio del estudio es conocer las características de las células que participan en la fisiopatología de la enfermedad. Este conocimiento en un futuro podría impactar en la elección del tratamiento.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a: Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo de 9:00 a 16:00 hrs., de lunes a viernes, a los teléfonos: 5627 6900 ext. 21370, en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica ubicada en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Investigador Responsable: Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo

Colaboradores:

- Dr. César Maldonado García. Clínica de Psoriasis Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua Tel. 55 32 56 38 ext: 310.
- Dra Diana Edith Fernández Madinaveitia. Médico adscrito al Servicio de Dermatología del Hospital General de Zona 1 A Venados, IMSS, Tel. 56 05 16 13 ext: 21315.
- Dra. Alicia Lemini López. Médico adscrito al servicio de Dermatología. Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI. IMSS. Tel.: 56 27 69 00 ext: 21535.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Col. Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com

Nombre y firma del sujeto

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Carta de consentimiento informado



“Caracterización de Linfocitos Th17 patogénicos en pacientes con psoriasis activa: Implicación clínica”

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

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

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

Su participación en este estudio es completamente voluntaria.

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

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

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

Para poder realizarle la toma de muestra de sangre

1. **NO es necesario que se presente en ayuno.**
2. Tomaremos una muestra de sangre venosa de uno de sus brazos, aproximadamente 15 mL o el equivalente a una cucharada sopera.
3. Nos tardaremos aproximadamente de 5 a 10 minutos en tomarle la muestra de sangre.

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

Con respecto a las biopsias:

En caso de la piel lesionada, la biopsia será tomada de una zona de piel que se encuentre afectada por una lesión de psoriasis al momento de su consulta. El sitio de la biopsia será definido entre usted y el médico, ya que al ser un procedimiento que deja cicatriz, usted podría preferir que se realice en zonas no expuestas.

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

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

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

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

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

La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla/o (como su nombre, teléfono, dirección, etc.) será guardada de manera confidencial y por separado, al igual que

sus respuestas a los cuestionarios y los resultados de sus pruebas clínicas, en caso de ser solicitadas; todo esto con la finalidad de garantizar su privacidad.

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

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

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

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

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

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

Dr. César Maldonado

Clínica de Psoriasis Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua

Tel. 55 32 56 38 ext: 310

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

Declaratoria del Paciente.

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

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

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

Nombre del Participante

_____ _____
Firma del Participante Fecha y hora

Declaratoria de quien toma el consentimiento informado.

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

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

_____ _____
Firma del encargado de obtener el CI Fecha y hora

Declaratoria de testigos.

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

Nombre del Testigo 1

Parentesco con participante

Firma del Testigo

Fecha y hora

Nombre del Testigo 2

Parentesco con participante

Firma del Testigo

Fecha y hora

Manuela Pigors¹, John E.A. Common²,
Xuan Fei Colin C. Wong², Sajid Malik³,
Claire A. Scott¹, Niloofar Tabarra¹,
Herty Liany⁴, Jianjun Liu⁴,
Vachiranee Limviphuvadh⁵,
Sebastian Maurer-Stroh⁵, Mark
B.Y. Tang⁶, Nicholas Lench⁷, David
J. Margolis⁸, David A. van Heel¹,
Charles A. Mein⁹, Natalija Novak¹⁰,
Hansjörg Baurecht¹¹,
Stephan Weidinger¹¹, W.H.
Irwin McLean¹², Alan D. Irvine^{13,14,15},
Edel A. O'Toole¹, Michael
A. Simpson^{16,17} and David
P. Kelsell^{1,17,*}

¹Blizard Institute, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, London, UK; ²Institute of Medical Biology, ASTAR, Singapore; ³Department of Animal Sciences, Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan; ⁴Genome Institute of Singapore, A*STAR, Singapore, Singapore; ⁵Bioinformatics Institute, A*STAR, Singapore; ⁶National Skin Centre, Singapore, Singapore; ⁷Congenica Limited, Genome Campus, Hinxton, UK; ⁸Department of Biostatistics and Epidemiology and Dermatology, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, USA; ⁹The Genome Center, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, London, UK; ¹⁰Department of Dermatology and Allergy, University Hospital Bonn, Bonn,

Germany; ¹¹Department of Dermatology, Allergology and Venereology, University Hospital Schleswig-Holstein, Kiel, Germany; ¹²Dermatology and Genetic Medicine, University of Dundee, Dundee, UK; ¹³National Children's Research Centre, Our Lady's Children's Hospital Crumlin, Dublin, Ireland; ¹⁴Department of Paediatric Dermatology, Our Lady's Children's Hospital Crumlin, Dublin, Ireland; ¹⁵Department of Clinical Medicine, Trinity College Dublin, Dublin, Ireland; and ¹⁶Division of Genetics and Molecular Medicine, King's College London, Guy's Hospital, Great Maze Pond, London, UK
¹⁷These authors contributed equally to this work and are joint senior authors.
*Corresponding author e-mail: d.p.kelsell@qmul.ac.uk

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.jidonline.org, and at <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.05.013>.

REFERENCES

- Ben-Gashir MA, Seed PT, Hay RJ. Predictors of atopic dermatitis severity over time. *J Am Acad Dermatol* 2004;50:349–56.
- Gunther V, Lindert U, Schaffner W. The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1416–25.
- Gururaj C, Federman RS, Chang A. Orm proteins integrate multiple signals to maintain sphingolipid homeostasis. *J Biol Chem* 2013;288:20453–63.
- Kimura T, Kambe T. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: an overview and perspective. *Int J Mol Sci* 2016;17:336.

- Krutmann J, Liu W, Li L, Pan X, Crawford M, Sore G, et al. Pollution and skin: from epidemiological and mechanistic studies to clinical implications. *J Dermatol Sci* 2014;76:163–8.
- Margolis DJ, Gupta J, Apter AJ, Hoffstad O, Papadopoulos M, Rebbeck TR, et al. Exome sequencing of filaggrin and related genes in African-American children with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2014;134:2272–4.
- Nutten S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr Metab* 2015;66(suppl 1):8–16.
- Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, Robertson CF, Asher MI, ISAAC Phase Three Study Group. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1251–1258 e23.
- Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, O'Regan GM, Clayton TH, Watson RM, et al. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat Genet* 2007;39:650–4.
- Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, Topol EJ. Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Curr Opin Genet Dev* 2009;19:212–9.
- Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010;38:e164.
- Wong XFCC, Denil SLIJ, Foo JN, Chen H, Tay ASL, Haines RL, et al. Array-based sequencing of filaggrin gene for comprehensive detection of disease-associated variants. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:814–6.

SEB Stimulation Induces Functional Pathogenic Features in Th17 Cells from Psoriasis Patients

Journal of Investigative Dermatology (2018) **138**, 2677–2681; doi:10.1016/j.jid.2018.05.024

TO THE EDITOR

Psoriasis is a chronic inflammatory cutaneous disease in which CD4⁺ T-cell lymphocytes expressing IL-17 have been identified (Lowe et al., 2014), and IL-17 blockers have shown outstanding results in psoriasis treatment (Leonardi et al., 2012). Chronic inflammatory models have shown plasticity of T helper type (Th) 17 cells to acquire Th1 features. Conventional Th17 cells express ROR γ t and IL-17 but not IFN- γ , whereas after plasticity, Th17 cells express

ROR γ t, T-bet, Runx1, and IFN- γ and lose IL-17 expression (Lee et al., 2012). Thus, the balance of these master transcription factors and the cytokine environment including IL-1 β and IL-23 (Annunziato et al., 2014) is critical in the regulation of the Th17 phenotype. After plasticity, Th17 cells appear to have increased proliferation (Maggi et al., 2012), and they are defined as pathogenic because they can exacerbate disease in experimental models (Hirota et al., 2011).

In human pathologies including psoriasis, high numbers of IL-17/IFN- γ double-positive CD4⁺ T cells have been identified (Lowe et al., 2008; Kagami et al., 2010). Recently, the lesional skin microbiome in psoriasis patients exhibited an increased presence of *Staphylococcus aureus* (Alekseyenko et al., 2013; Tett et al., 2017). In addition, *Staphylococcus aureus* enterotoxin-B (SEB) superantigen has been associated with psoriasis severity (Balci et al., 2009). Therefore, we evaluated the Th17 cell features in 52 lesional (LS) and 30 nonlesional skin (NLS) biopsy samples of psoriasis vulgaris patients after SEB stimulation (see Supplementary Table S1 online). Medical ethics

Abbreviations: LS, lesional skin; NLS, nonlesional skin; PB, peripheral blood; SEB, *Staphylococcus aureus* enterotoxin-B; Th, T helper lymphocyte

Accepted manuscript published online 8 June 2018; corrected proof published online 20 August 2018
© 2018 The Authors. Published by Elsevier, Inc. on behalf of the Society for Investigative Dermatology.



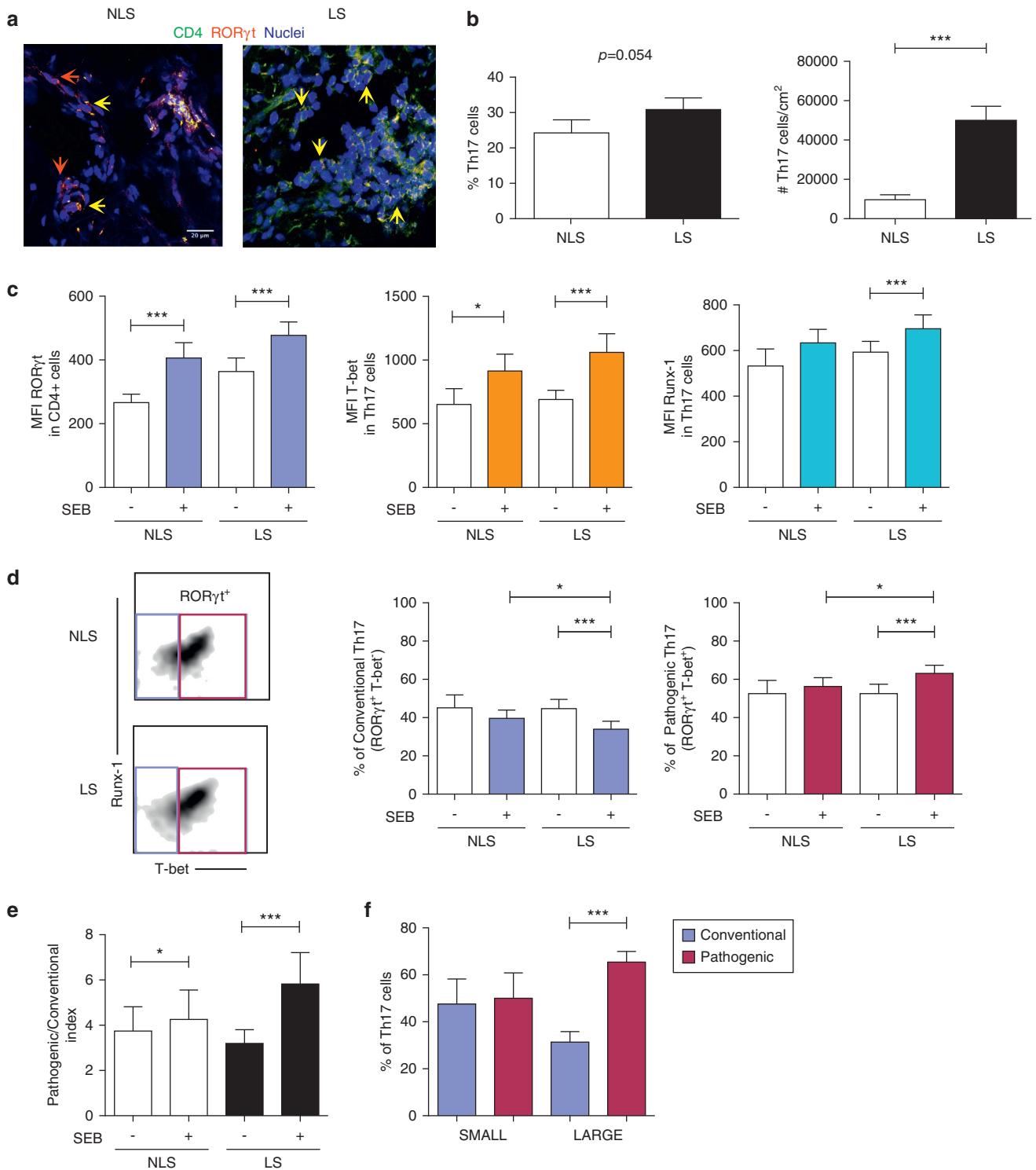


Figure 1. Increased pathogenic phenotype in Th17 cells after SEB stimulation in LS of psoriasis patients. (a) NLS and LS immunofluorescence with anti-CD4 (green), anti-RORγt (red), and nuclei (blue). Arrows indicate CD4⁺/RORγt⁺ (yellow) and CD4⁺RORγt⁺ cells (red). (b) Percentage and absolute numbers of Th17 cells in NLS and LS. (c) Median fluorescence intensities (MFIs) of RORγt, T-bet, and Runx1 before and after SEB treatment. (d) Representative plots and percentages of conventional and pathogenic Th17 cells in NLS and LS. (e) Pathogenic/conventional index, according to the cell percentage in each condition. (f) Percentage of conventional and pathogenic Th17 cells in patients with small and large plaques after SEB stimulation. NLS, n = 23; LS, n = 38. *P < 0.05, ***P < 0.001, Mann-Whitney U test, Wilcoxon signed-rank test. LS, lesional skin; NLS, nonlesional skin; SEB, *Staphylococcus aureus* enterotoxin-B; Th, T helper lymphocyte.

committees from the Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua and Instituto Mexicano del Seguro Social approved this study, and written

informed consent was obtained from all patients.

In LS, we found several CD4⁺ and CD4⁺RORγt⁺ T cells and some

CD4⁻RORγt⁺ cells compared with NLS from the same patient (Figure 1a). The number of Th17 cells determined through the expression of transcription factor

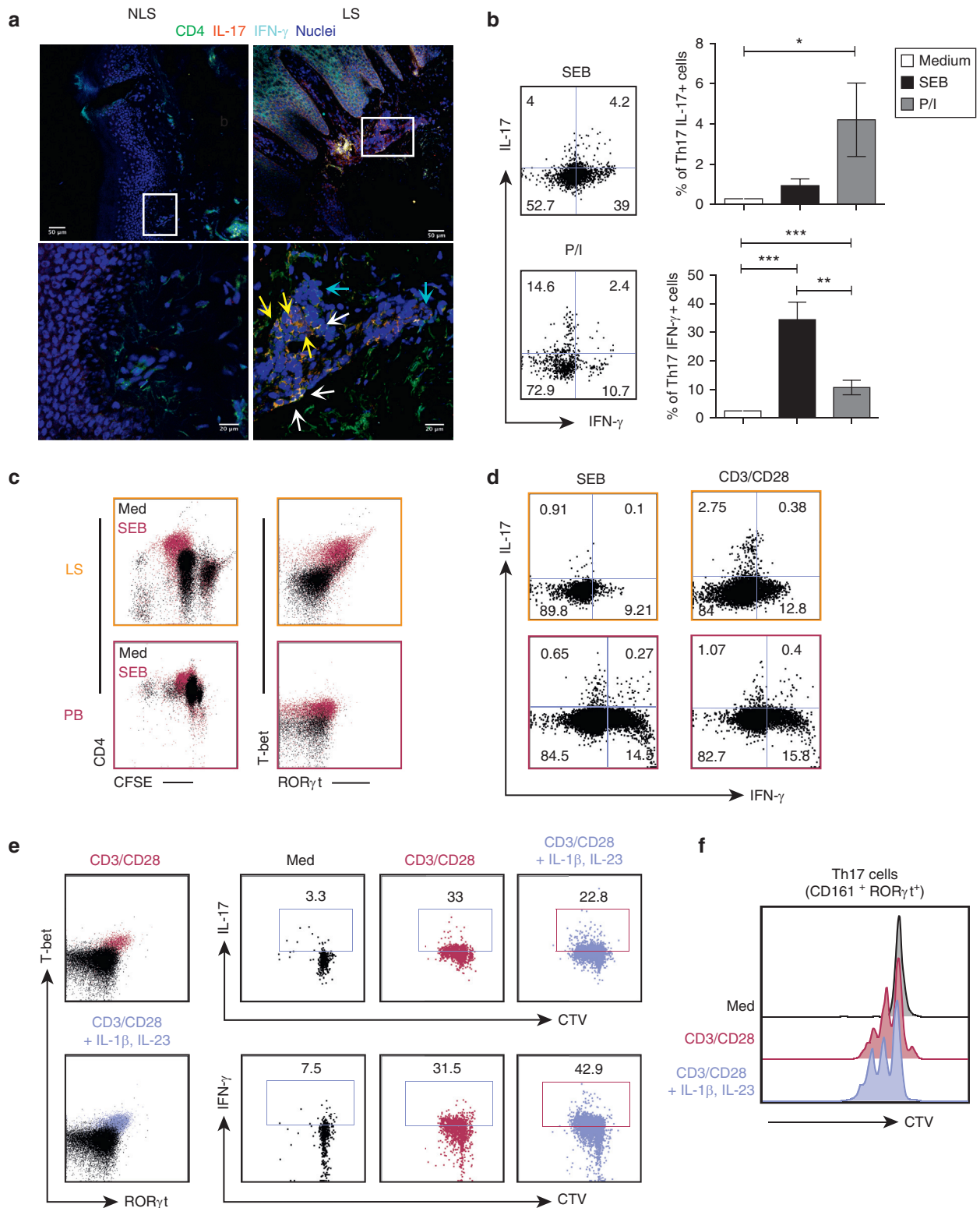


Figure 2. SEB and CD3/CD28 induce functional plasticity features in the Th17 lymphocytes of psoriasis patients. (a) NLS and LS immunofluorescence for CD4 (green), IL-17 (red), IFN- γ (cyan), and nuclei (blue). Zoom region (white square). Arrows indicate CD4⁺/IL-17⁺ (yellow), CD4⁺/IFN- γ ⁺ (cyan), and CD4⁺/IL-17⁺/IFN- γ ⁺ (white) cells. Representative of three patients. (b) Plots and percentage of the Th17 cells IL-17⁺ or IFN- γ ⁺ after SEB or phorbol 12-myristate 13-acetate/ionomycin activation (P/I) (n = 10). (c) CD4⁺ T-cell proliferation and expression of ROR γ t and T-bet after SEB treatment. (d) IL-17⁺ or IFN- γ ⁺ Th17 cells after SEB or anti-CD3/CD28 stimulation. (LS orange plots, PB red plots). (e) Expression of ROR γ t, T-bet, IL-17, IFN- γ and (f) proliferation in purified PB Th17 cells after CD3/CD28 or CD3/CD28 plus IL-1 β /IL-23 stimulation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Wilcoxon signed-rank test. CTV, CellTrace Violet; LS, lesional skin; NLS, nonlesional skin; PB, peripheral blood; SEB, *Staphylococcus aureus* enterotoxin-B; Th, T helper lymphocyte.

ROR γ t (see [Supplementary Figure S1a](#) online) was higher in LS than in NLS ([Figure 1b](#)). SEB stimulation increased the expression of ROR γ t in CD4⁺ T cells and T-bet in Th17 cells in both LS and NLS, whereas Runx1 expression was increased only in LS ([Figure 1c](#), and see [Supplementary Figure S1b](#)). These findings are consistent with a decrease and an increase in the percentages of conventional Th17 and pathogenic Th17 cell phenotypes in LS, respectively ([Figure 1d](#)). Moreover, the pathogenic/conventional index increased significantly in NLS and LS after SEB stimulation ([Figure 1e](#)). After SEB activation, the percentage of Th17 cells with a pathogenic phenotype increased only in patients with large plaques ([Figure 1f](#)). These results indicate that SEB stimulation increases the pathogenic phenotype of Th17 cells, suggesting an association with the large plaque form of the disease.

Considering the mixture of conventional and pathogenic Th17 lymphocytes in NLS and LS, we sought to determine the in situ expression of IL-17 and IFN- γ in CD4⁺ T cells. NLS contains few CD4⁺ T cells, and we could not detect the expression of IL-17 and IFN- γ . In contrast, LS images of the same patient showed high CD4⁺ T-cell infiltration that expressed either IL-17 or IFN- γ and, strikingly, IL-17/IFN- γ double-positive CD4⁺ T cells ([Figure 2a](#), white arrows).

Next, we evaluated whether SEB stimulation affected the function of Th17 cells. In LS, most Th17 cells lack IL-17 but highly express IFN- γ , but a small population expresses both IL-17 and IFN- γ after SEB stimulation. In contrast, there were IL-17⁺ and IL-17⁺/IFN- γ ⁺ and fewer IFN- γ ⁺ Th17 cells after phorbol 12-myristate 13-acetate/ionomycin activation ([Figure 2b](#)). In NLS, healthy skin, or skin with another pathology such as atopic dermatitis, Th17 cells lack or have a lower expression of IL-17 and IFN- γ after activation (see [Supplementary Figure S2a](#) online). In addition, in patients with a high Psoriasis Area Severity Index score, SEB stimulation induces a pathogenic microenvironment as evidenced by significant quantities of IFN- γ and tumor necrosis factor- α and low levels of IL-17 and IL-9 (see [Supplementary Figures S3a–d](#) online). These results strongly suggest the acquisition of functional plasticity features in

Th17 cells from LS after SEB stimulation; this could be explained by the increase in Runx1 only in LS, which could dimerize with T-bet and in turn inhibit IL-17 expression ([Lazarevic et al., 2010](#)).

To elucidate whether the acquisition of plasticity features in Th17 cells was restricted to skin-resident Th17 cells, we compared the proliferation and cytokine expression of Th17 cells from LS and peripheral blood (PB) from the same patient. LS cells without stimulation showed proliferation, which increased after SEB stimulation, whereas PB cells showed lower proliferative capabilities ([Figure 2c](#)). The expansion of CD4⁺ T cells from LS occurred with increased expression of the transcription factors ROR γ t and T-bet ([Figure 2c](#)). In addition, the plasticity features were evaluated with another TCR stimulus such as anti-CD3/CD28. After SEB stimulation, the Th17 cells from LS only expressed IFN- γ , whereas the anti-CD3/CD28-stimulated cells were IL-17⁺ and IFN- γ ⁺. In contrast, after SEB or anti-CD3/CD28 activation of the PB Th17 cells, we found IL-17⁺, IFN- γ ⁺/IL-17⁺, and IFN- γ ⁺ cells ([Figure 2d](#)). These results suggest that the acquisition of plasticity features in Th17 cells occurs in LS and PB after SEB or anti-CD3/CD28 stimulation; however, fully functional plasticity features were observed only in LS.

Finally, using CD161 as a Th17 cell marker ([Cosmi et al., 2008](#)), we sorted the Th17 cells from the PB of psoriasis patients (see [Supplementary Figure S4a](#) online) and investigated whether plasticity features are acquired in isolated cells with TCR stimulation only or TCR stimulation with IL-1 β and IL-23, which are increased in LS ([Pietrzak et al., 2008](#)). After activation with anti-CD3/CD28 or anti-CD3/CD28 plus cytokines, we found an increased expression of ROR γ t and T-bet. The Th17 cells activated with anti-CD3/CD28 expressed both IL-17 and IFN- γ ; however, anti-CD3/CD28 plus cytokine stimulation showed a decrease in IL-17⁺ and increase in IFN- γ ⁺ cells ([Figure 2e](#)). We also found the proliferation of Th17 cells after anti-CD3/CD28 activation, whereas the cytokines induced a more robust proliferation in the last cycle ([Figure 2f](#)). These results suggest that proliferation and

plasticity features are acquired in isolated Th17 cells after TCR stimulation and can be enhanced by the presence of inflammatory cytokines. This research unveils a role for SEB in the physiopathology of psoriasis through the induction of plasticity features of Th17 cells toward a pathogenic profile that could contribute to inflammation. The acquisition of Th17 plasticity features might have implications in disease severity and in the biological treatment of psoriasis patients.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank all of the patients who kindly accepted to participate in this study. We thank Vadim Pérez Koldenkova and Jessica Lakshmi Prieto Chávez for their technical support in confocal microscopy and flow cytometry at Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada and the Centro de citometría from Coordinación en Salud at Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS. We acknowledge the Academic Writing Team of the Centro de Estudios de Posgrado, UNAM for their help with this manuscript. This study was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE (S00082017/1-290138). OCE is doctoral student from Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM and received fellowship 267839 from CONACYT. CAF received fellowship 621839 from CONACYT.

**Octavio Castro-Escamilla^{1,2},
Cristina Aguilar-Flores^{1,3}, Luz
María Mora-Velandia¹, Karina Morán-
Martínez⁴, Diana Edith Fernández-
Madinaveitia⁵, Alicia Lemini-López⁶,
Elizabeth González-Palacios⁴,
César Maldonado-García⁴,
Fermín Jurado-Santa Cruz⁴,
Gibrán Pérez-Montesinos⁴ and
Laura C. Bonifaz^{1,*}**

¹Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México City, México; ²Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, México; ³Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN), México City, México; ⁴Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, Secretaría de Salud de la Ciudad de México, México City, México; ⁵Servicio de Dermatología, Hospital General de Zona 1 A Venados, Instituto Mexicano del Seguro Social, México City, México; and ⁶Servicio de Dermatología, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México City, México

*Corresponding author e-mail: labonifaz@yahoo.com

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.jidonline.org, and at <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.05.024>.

REFERENCES

- Alekseyenko AV, Perez-Perez GI, De Souza A, Strober B, Gao Z, Bihan M, et al. Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis. *Microbiome* 2013;1:31.
- Anunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities. *Immunology* 2014;144:343–51.
- Balci DD, Duran N, Ozer B, Gunesacar R, Onlen Y, Yenin JZ. High prevalence of *Staphylococcus aureus* cultivation and superantigen production in patients with psoriasis. *Eur J Dermatol* 2009;19:238–42.
- Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161 +CD4 +T cell precursor. *J Exp Med* 2008;205:1903–16.
- Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 2011;12:255–63.
- Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010;130:1373–83.
- Lazarevic V, Chen X, Shim J-H, Hwang E-S, Jang E, Bolm AN, et al. T-bet represses T. *Nat Immunol* 2010;12:96–104.
- Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 2012;13:991–9.
- Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E, et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med* 2012;366:1190–9.
- Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* 2008;128:1207–11.
- Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol* 2014;32:227–55.
- Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Rossi MC, Querci V, Mazzoni A, et al. Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *Eur J Immunol* 2012;42:3180–8.
- Pietrzak AT, Zalewska A, Chodorowska G, Krasowska D, Michalak-Stoma A, Nockowski P, et al. Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin Chim Acta* 2008;394(1–2):7–21.
- Tett A, Pasolli E, Farina S, Truong DT, Asnicar F, Zolfo M, et al. Unexplored diversity and strain-level structure of the skin microbiome associated with psoriasis. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017;13:1–11.

An Integrated Data Resource for Genomic Analysis of Cutaneous T-Cell Lymphoma

Journal of Investigative Dermatology (2018) **138**, 2681–2683; doi:10.1016/j.jid.2018.06.176

TO THE EDITOR

Recently, several groups have conducted deep sequencing studies of small cohorts of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) genomes to identify disease driving mutations and therapeutic targets (Choi et al., 2015; da Silva Almeida et al., 2015; McGirt et al., 2015; Prasad et al., 2016; Ungewickell et al., 2015; Wang et al., 2015; Woollard et al., 2016). The low incidence rate of CTCL (Korgavkar et al., 2013) makes it difficult to conduct such investigations; therefore, combining multiple small cohorts may increase the statistical power for identifying rarer mutations and key disease pathways (Park et al., 2017) and may uncover genomic types of CTCL, which may guide future therapies via selective targeting of mutation-specific patient populations. For many cancers, integrated genomic datasets are accessible via centralized portals such as cBioPortal, but a similar resource for CTCL is not available. Here we have collected, selected, and re-analyzed

individual datasets whenever raw data were available to generate high-quality, homogeneous data, and we present the compilation and analysis of this integrated dataset in CTCL, including matching genomic mutations and gene copy number profiling for all cases. Most importantly, our database can be expanded as more CTCL studies are published.

We compiled genomic data of 139 CTCL cases from seven sequencing studies of mycosis fungoides and Sézary syndrome (SS) (Supplementary Table S1 online). We identified 11,520 single nucleotide mutations and 1,248 insertions/deletions in 121 SS cases (Supplementary Table S2 online), and 1,774 single nucleotide mutations and 37 insertions/deletions in 18 mycosis fungoides cases (Supplementary Table S3 online). In parallel, gene copy number analysis resulted in 682,298 and 60,067 genomic regions in SS and mycosis fungoides cases (Supplementary Tables S4 and S5 online), providing additional information

and confirming consistency with previous studies (Lin et al., 2012) (Supplementary Figure S1 online).

To identify significantly mutated genes in the entire database, we took a Poisson statistics-based approach (Crescenzo et al., 2015), taking into account the effective length of a gene (Nei and Gojobori, 1986). Briefly, Poisson probabilities of observing a given number of mutations or more were calculated and corrected for multiple hypothesis testing by the Benjamini-Hochberg method. We found 125 significantly mutated genes with a corrected *P*-value <0.05 (Supplementary Table S6 online). Twenty of these genes were known oncogenes in the COSMIC cancer gene census. Most frequently mutated oncogenes were *TP53* (19%), *PLCG1* (10%), *CARD11* (7%), *DNMT3A* (6%), *FAS* (6%), *POT1* (6%), *RHOA* (3%), *KIT* (5%), and tumor necrosis factor receptor 2 (*TNFRSF1B*) (4%). The complete genomic metadata including the identified frequently mutated genes are available for download from the Dryad Digital Repository (<https://www.datadryad.org/>).

One of the important problems we were able to address, which was not



Abbreviations: CTCL, cutaneous T-cell lymphoma; SS, Sézary syndrome

Accepted manuscript published online 5 July 2018; corrected proof published online 17 September 2018
© 2018 The Authors. Published by Elsevier, Inc. on behalf of the Society for Investigative Dermatology.



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

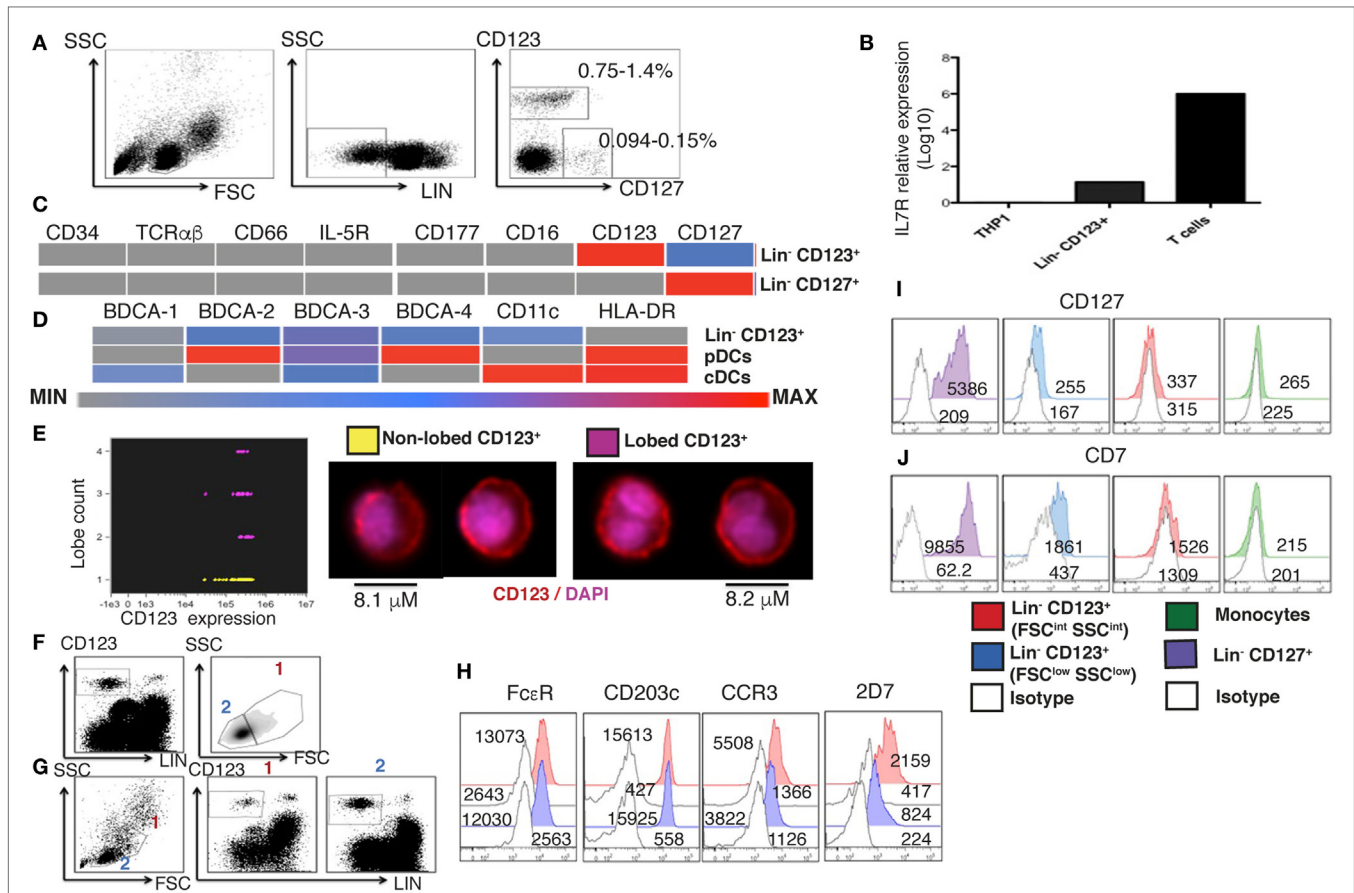


FIGURE 1 | A human Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population with lymphoid and basophil features in peripheral blood. (A) From left to right: gate analysis on lymphoid cells, exclusion of lineage positive cells and identification of Lin⁻ CD123⁺ and Lin⁻ CD127⁺ populations. Cell frequencies (%) data represent 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 $\alpha\beta$), 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

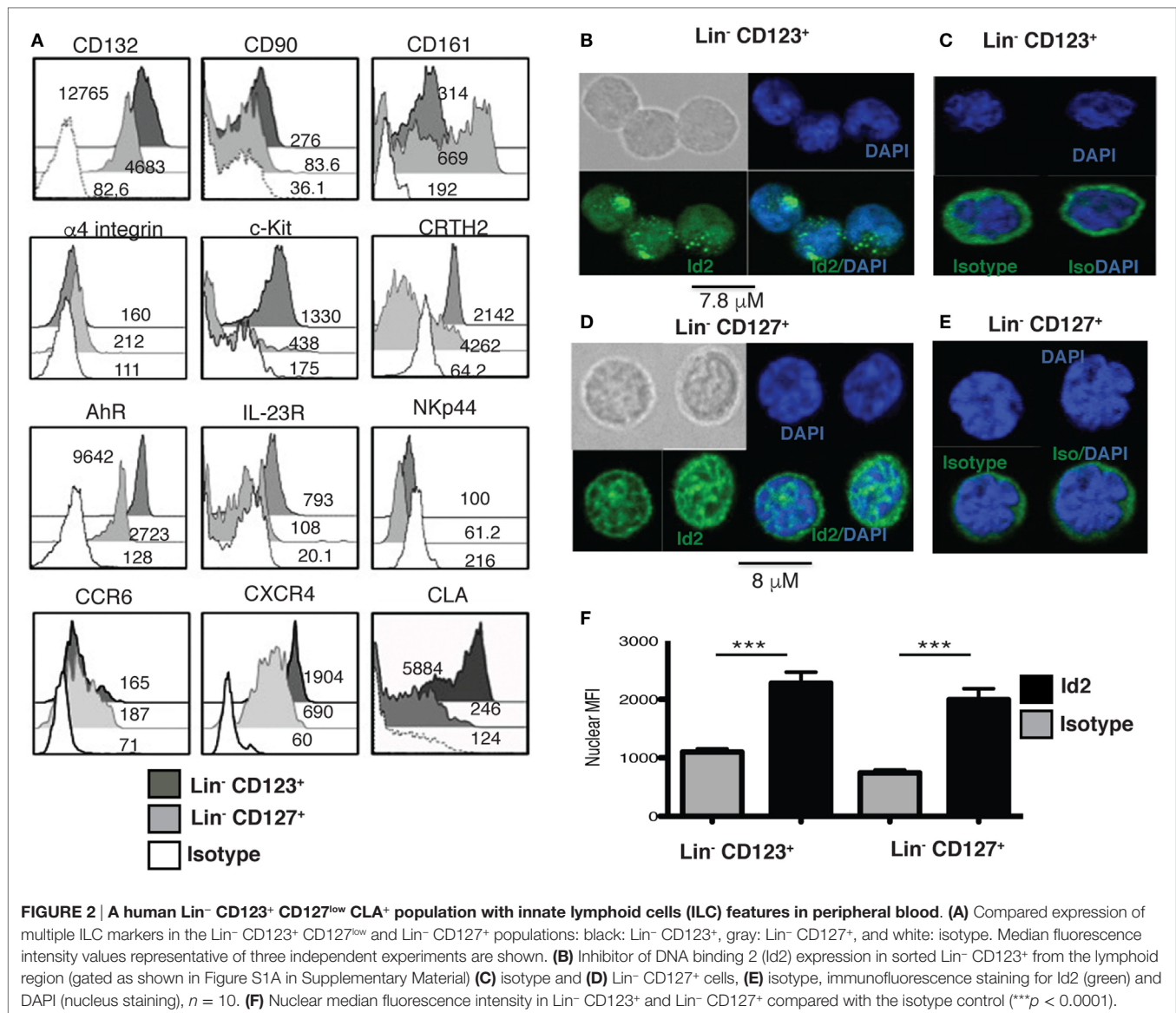
the expression of NFIL3, PLZF, and TOX in the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population in contrast to the CD127⁺ population (**Figures 3B–E**). These findings suggest that IL-3 has two main roles in the CD123⁺ CD127^{low} population: maintenance of cell survival and the upregulation of crucial transcriptional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

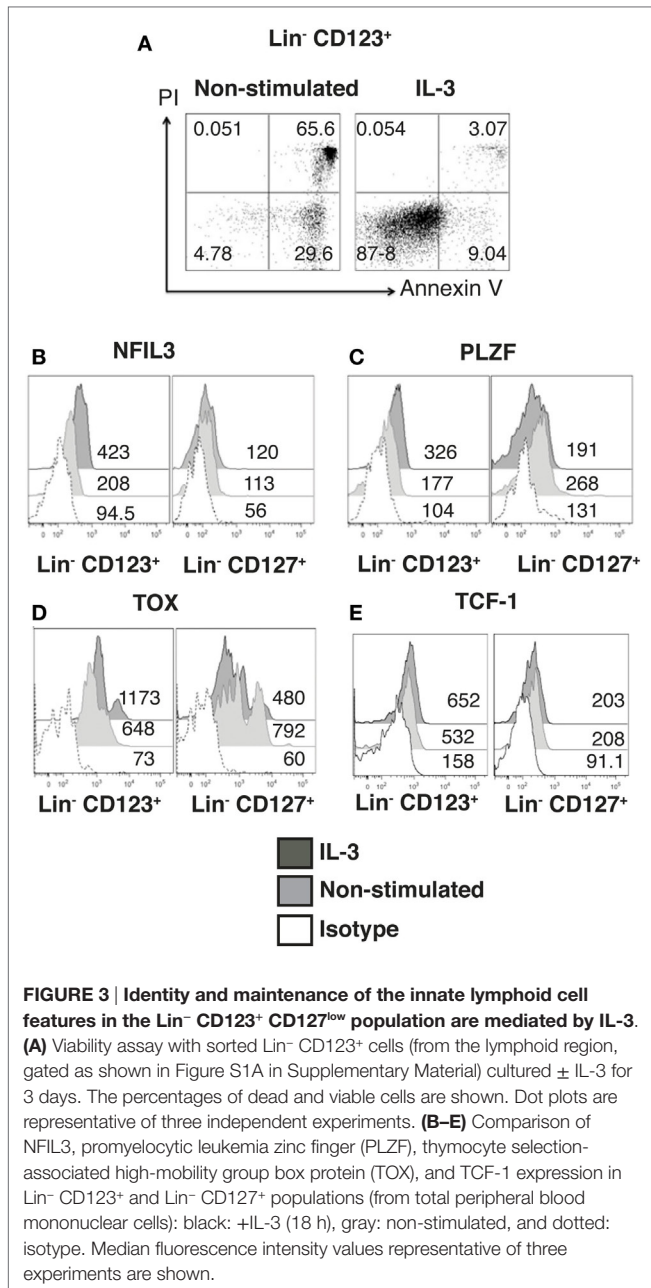


population. The culture with the ILC2 cocktail (IL-33 and IL-2) did not induce the expression of ILC2 type cytokines, such as IL-4 or IL-13, and the culture with the ILC3 cocktail (IL-1 β , IL-2, and IL-23) did not induce the expression of ILC3 type cytokines, such as IL-17 or IL-22 (Figure S3 in Supplementary 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

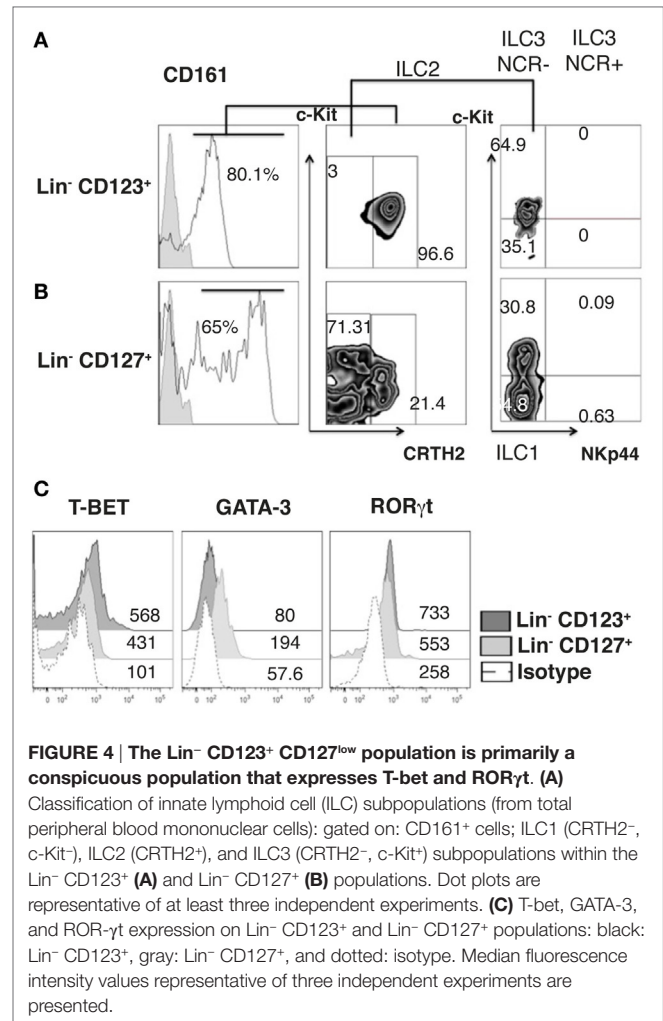
We subsequently isolated the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population from the lymphoid region and CD127⁺ ILC population to evaluate the cytokines in the supernatants via a multiplex assay after activation. Surprisingly, the Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} population produced high levels of IL-8 and low levels of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

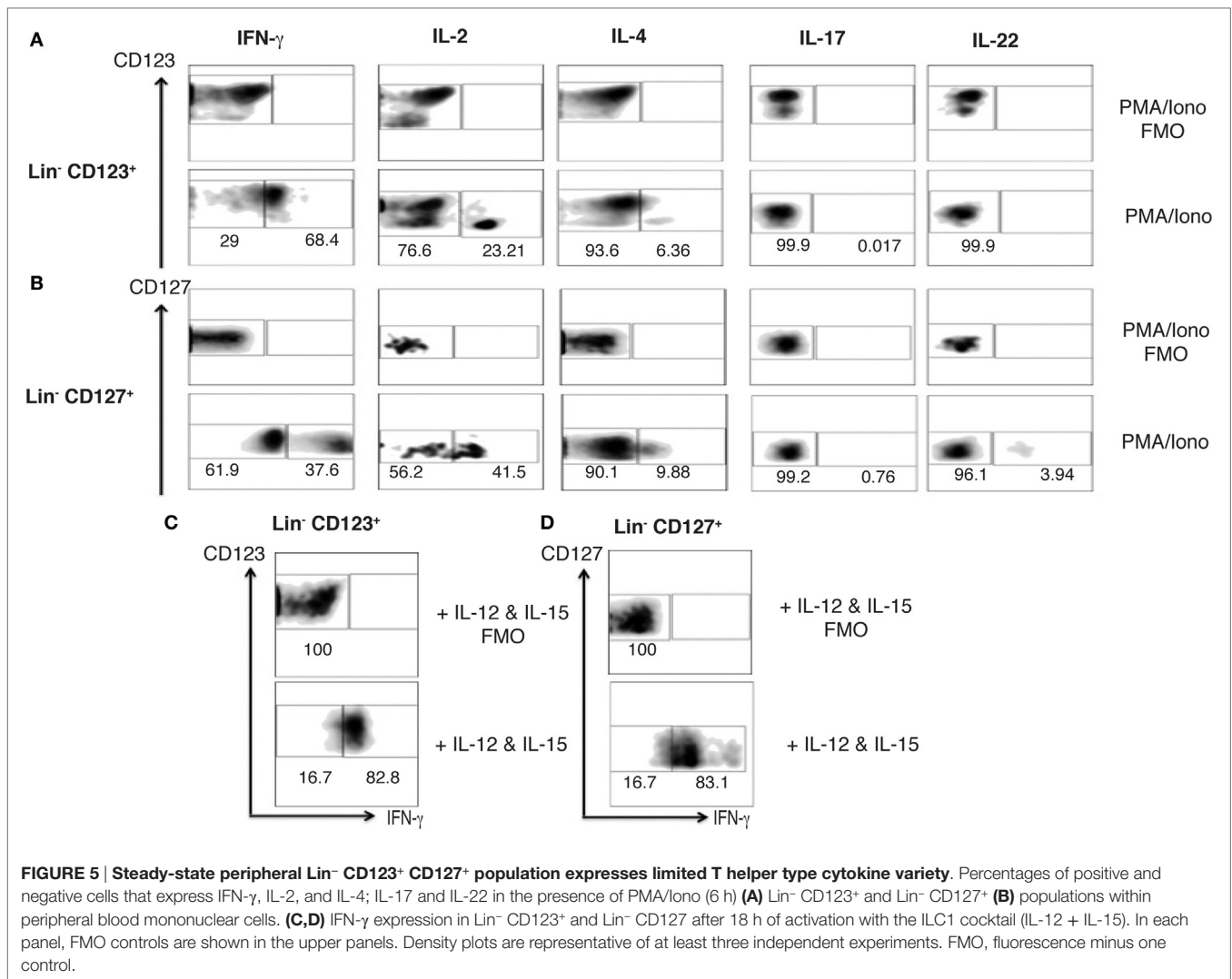


The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} CLA⁺ Population Has Migratory Potential Mediated by SDF-1

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

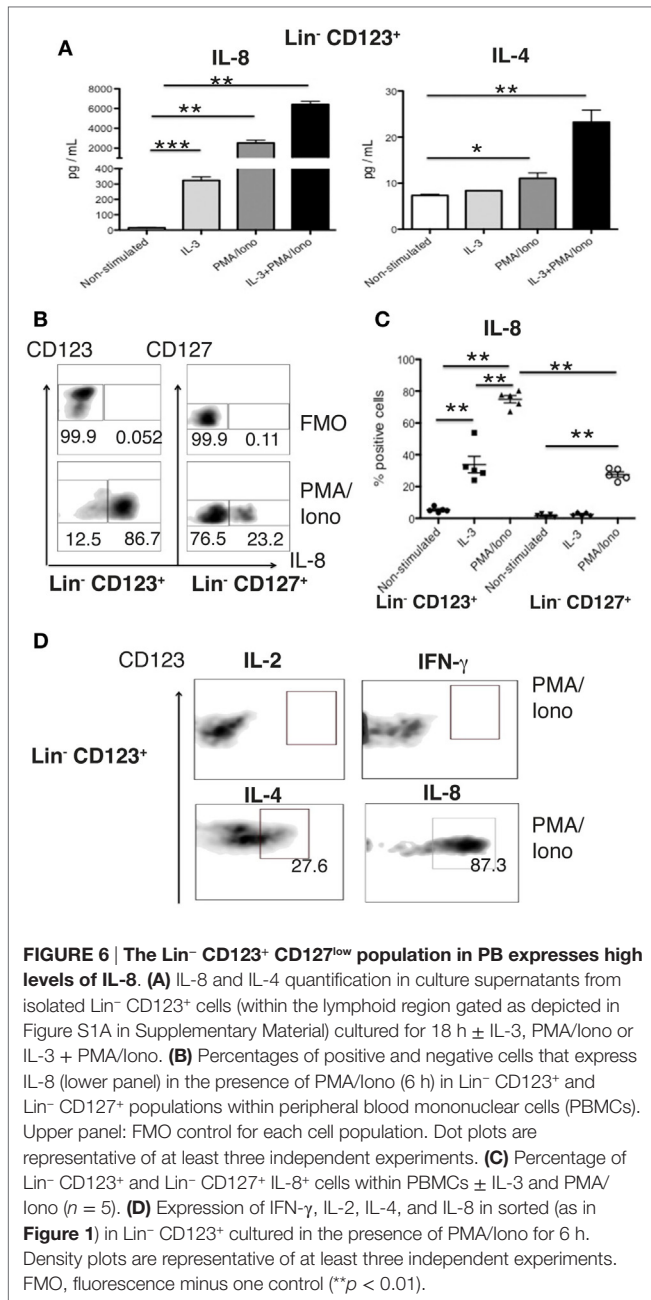
The majority of Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} cells within the lymphoid region downregulates CD123 and basophil markers such as Fc ϵ R, CCR3, and CD203c upon activation. In contrast, most CD123⁺ FSC^{int} SSC^{int} counterparts maintain the expression of these molecules (**Figures 8A–C**).

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).

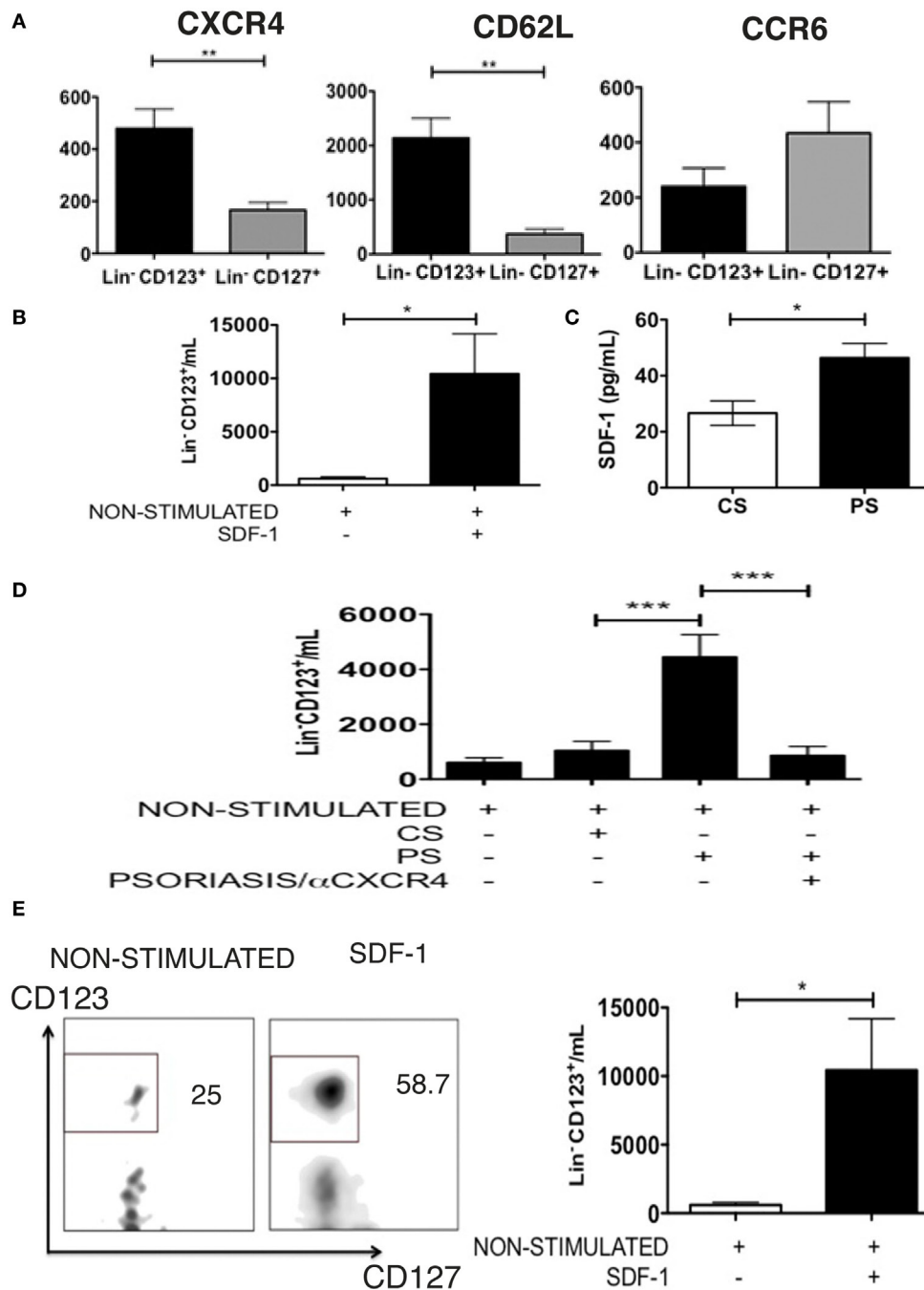
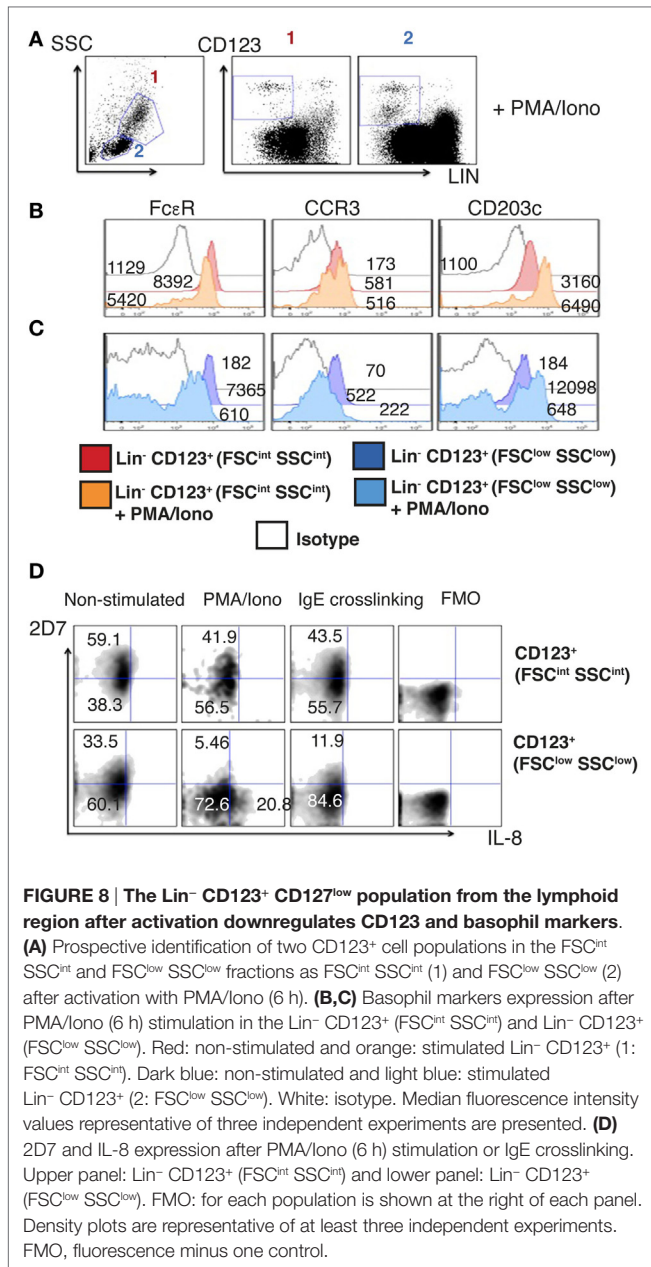


FIGURE 7 | The Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} CLA⁺ population has migratory potential mediated by SDF-1. (A) CXCR4 ($N = 6$), CD62L ($N = 5$), and CCR6 ($N = 6$) expression in Lin⁻ CD123⁺ and Lin⁻ CD127⁺ cells from PB of healthy donors; bar graph representation of median fluorescence intensity values ($n = 6$). **(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.

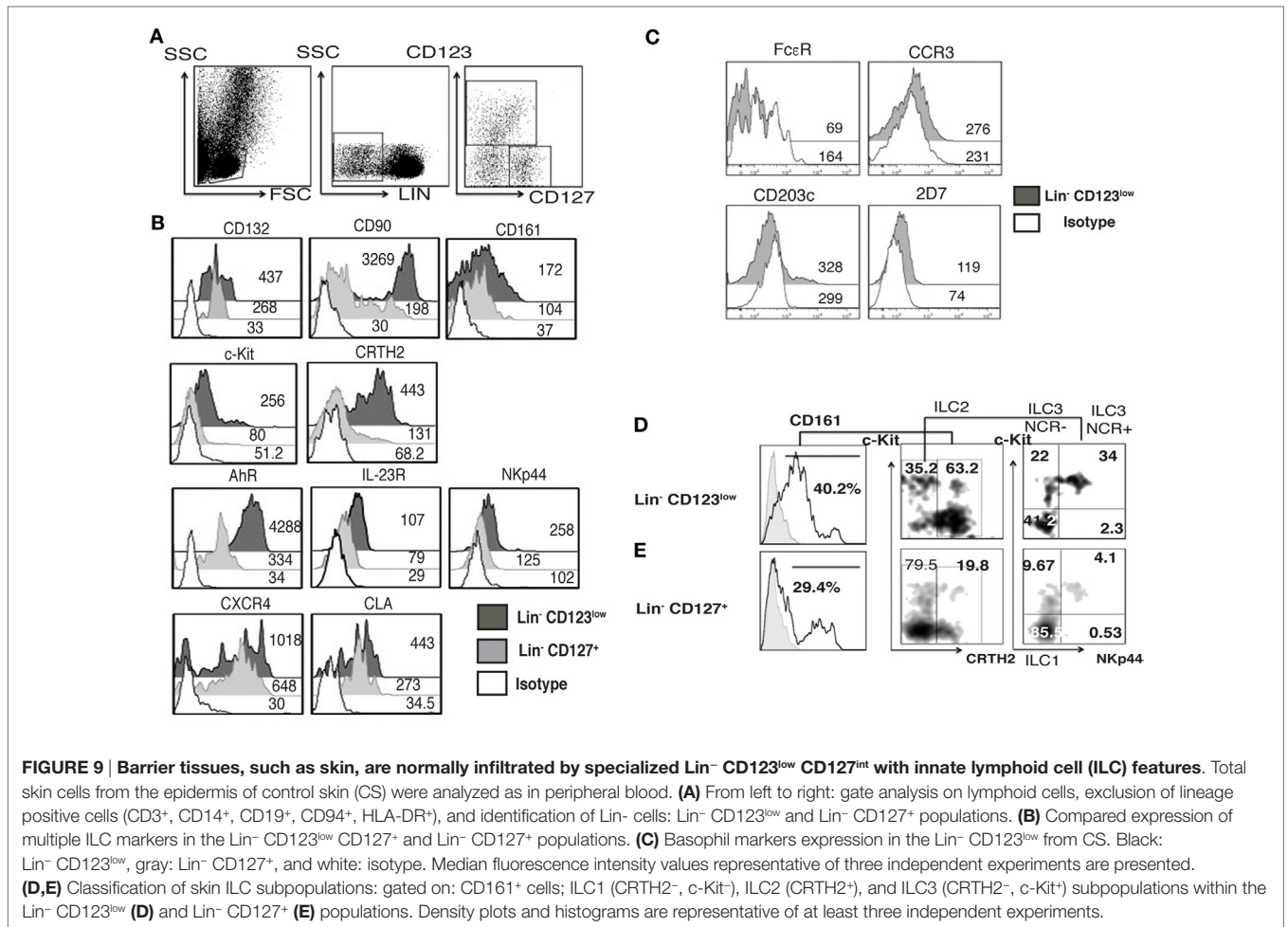
DISCUSSION

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-FceR 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,

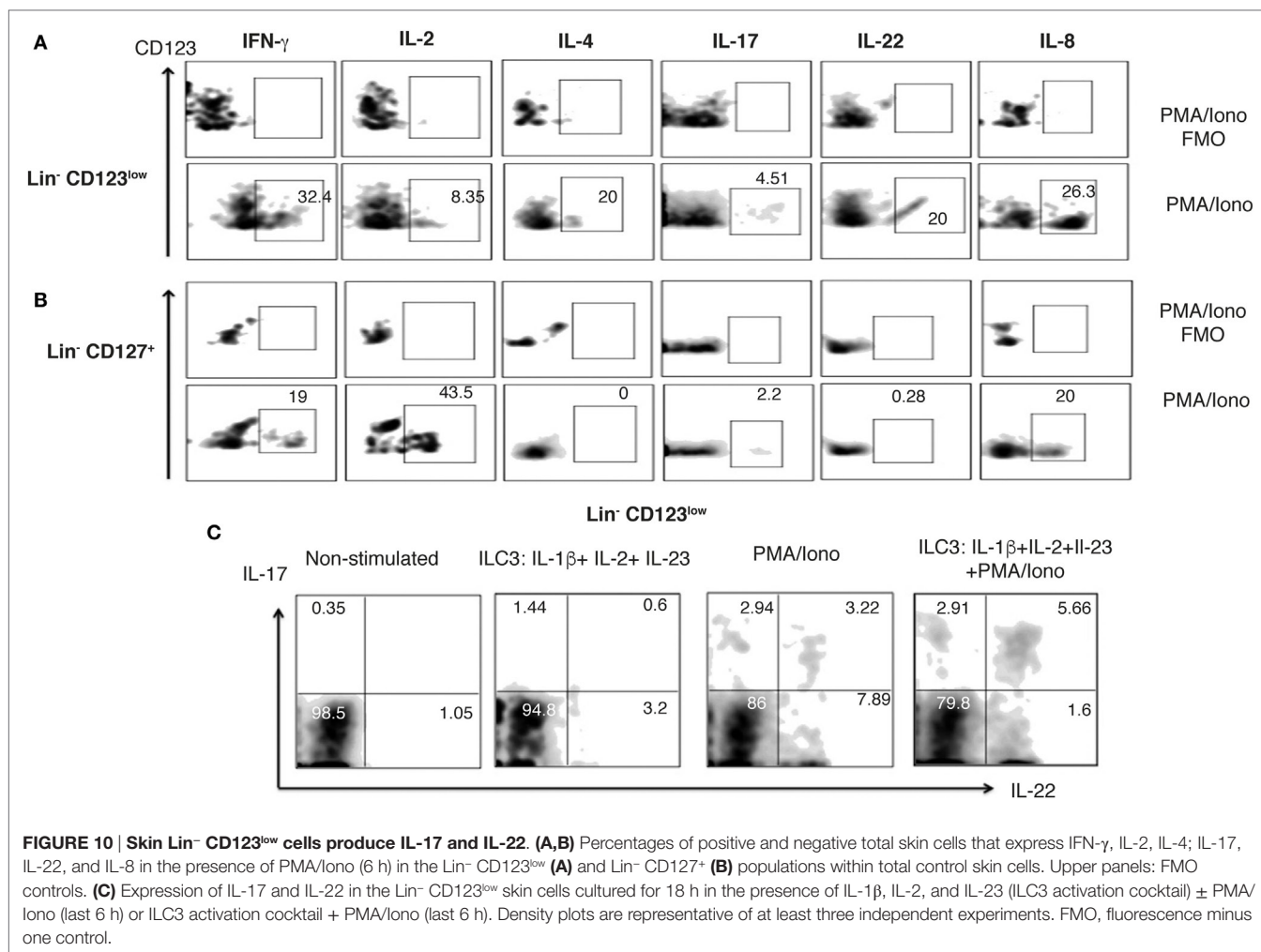


FIGURE 10 | Skin Lin⁻ CD123^{low} cells produce IL-17 and IL-22. (A,B) Percentages of positive and negative total skin cells that express IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-17, IL-22, and IL-8 in the presence of PMA/Iono (6 h) in the Lin⁻ CD123^{low} (A) and Lin⁻ CD127⁺ (B) populations within total control skin 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

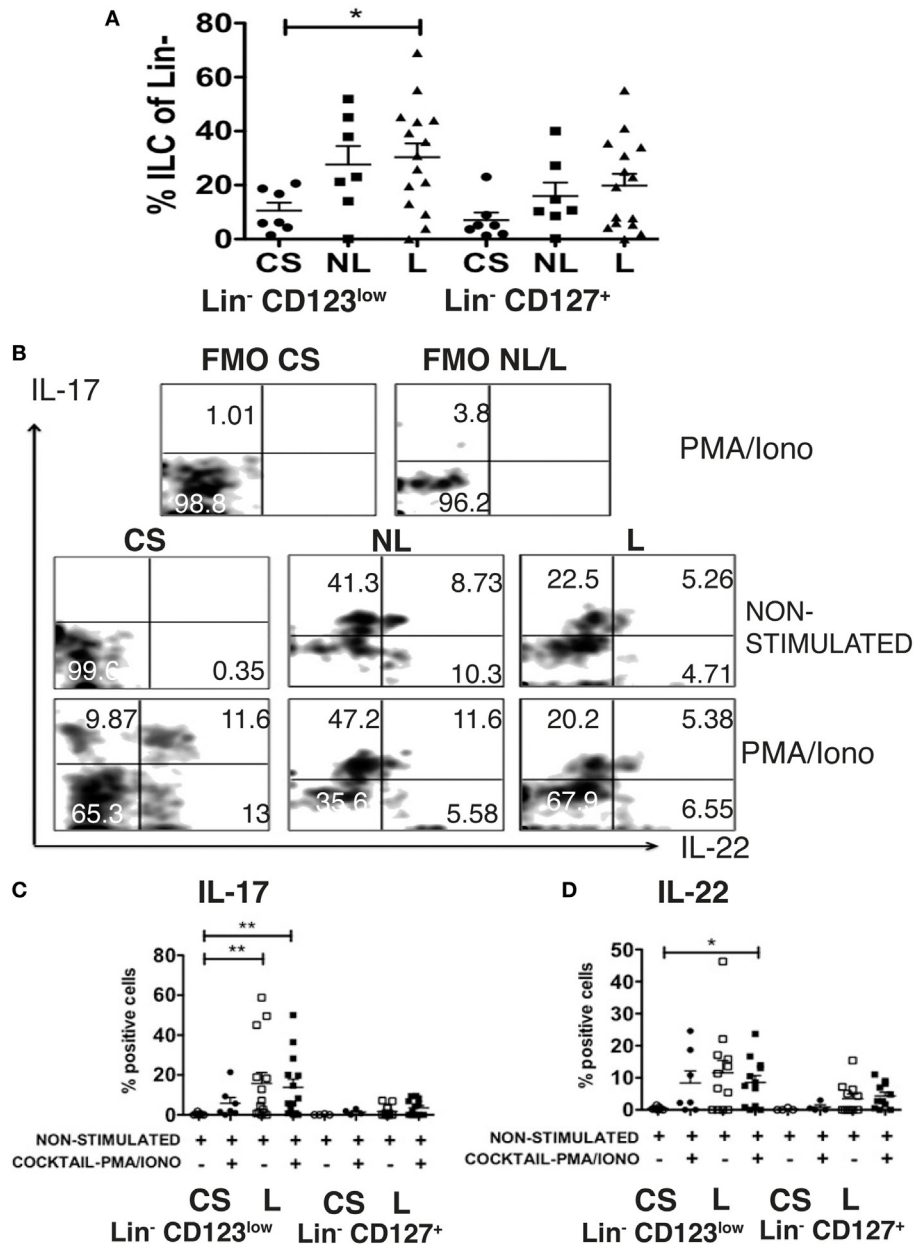


FIGURE 11 | SDF-1-dependent migration of Lin⁻ CD123^{low} CD127^{low} cells may precede activation and local production of IL-17 and IL-22 in psoriasis patients. (A) Frequencies of Lin⁻ CD123^{low} and Lin⁻ CD127⁺ populations in control skin (CS) $N = 7$, non-lesioned (NL) skin $N = 7$, and lesioned (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

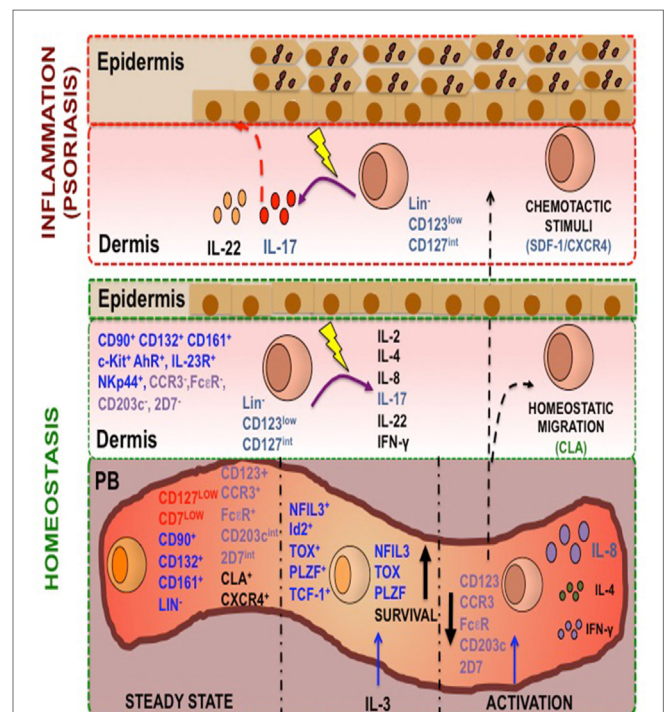


FIGURE 12 | A human Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} endowed with innate lymphoid cells (ILC) features and migratory capabilities contributes to immunopathological hallmarks of psoriasis. Peripheral blood (PB) contains a Lin⁻ CD123⁺ population with a mixture lymphoid (in red: CD127^{low} CD7^{low}) and basophil 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 LTi-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. Kloverpris 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.