



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

“Evaluación de la capacidad inmunosupresora  
de Células Estromales Mesenquimales  
provenientes de la piel de pacientes con  
psoriasis sobre la proliferación y citotoxicidad  
de células NK“

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

Presenta

**KEYRA QUETZAL RAMÍREZ MENES**

DIRECTOR DE TESIS

DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

ASESOR INTERNO

DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

Ciudad de México, 2020



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.

## **Agradecimientos**

A la universidad Nacional Autónoma de México en especial a la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”.

A mi director de tesis el Dr. Juan José Montesinos Montesinos por la oportunidad de realizar este trabajo, por todo su apoyo y orientación recibido durante el desarrollo de esta investigación.

A mi asesor interno el Dr. Jorge Flavio Mendoza rincón por creer en mí, por su confianza, su conocimiento y su apoyo.

A mis sinodales Dra. María de Lourdes Mora García, Dr. Edelmiro Santiago Osorio y M. en C. Reynalda Roldan Pérez por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Al M. en C. Víctor Adrián Cortés Morales y a la M. en C. Ana Gabriela Serrato López por sus enseñanzas, su valiosa ayuda, su paciencia y sobretodo por brindarme su amistad

A mis compañeros de laboratorio Marti, Adrián, Gaby, Lucero, Ixchel, Pilar, Erika, Carlos, Karen, Damián por la excelente compañía dentro del laboratorio y los buenos momentos fuera de él.

## **Dedicatoria**

A Itzia tan llena de energía, es el motor de mi vida.

A mis padres por todo su esfuerzo, cuidados, guía y amor  
puestos en mí.

A Martha y Bety que con su ejemplo y consejos me inspiran a  
dedicarme a la investigación.

A mis hermanos que son mis compañeros de vida y los que le  
ponen alegría.

A toda mi bella familia que siempre me ha cuidado y  
apoyado.

# Índice

I.	ABREVIATURAS .....	5
II.	RESUMEN .....	7
III.	MARCO TEÓRICO.....	9
1.	La piel.....	9
1.1.	Epidermis.....	10
1.2.	Dermis .....	12
1.3.	Sistema inmunitario de la piel.....	12
2.	Psoriasis.....	15
2.1.	Inmunopatogénesis de la psoriasis.....	18
3.	Células NK .....	21
4.	NK en el desarrollo de la psoriasis .....	25
5.	Células Estromales Mesenquimales (MSCs) .....	28
5.1.	Inmunomodulación sobre células NK .....	29
5.2.	MSCs provenientes de la dermis de pacientes con Psoriasis .....	32
IV.	Planteamiento del problema .....	35
V.	Hipótesis .....	37
VI.	Objetivos .....	38
1.	Objetivo general .....	38
2.	Objetivos particulares.....	38
VII.	Método .....	39
1.	Obtención de células estromales mesenquimales .....	39
2.	Obtención de células NK.....	40
3.	Co-cultivos y ensayos biológicos .....	41

3.1 Ensayo de proliferación.....	41
3.2 Ensayo de citotoxicidad.....	42
4.    Análisis estadístico.....	43
VIII. Resultados.....	44
1.    Las DS-MSCs y DP-MSCs disminuyen la proliferación de células NK en contacto celular.....	44
2.    Las DS-MSCs y DP-MSCs disminuyen la proliferación de la subpoblación NK <sup>Dim</sup> . .....	47
3.    Las DP-MSCs aumenta la actividad citotóxica de NK.....	51
IX.    Discusión .....	54
X.    Conclusiones.....	61
XI.    Perspectivas .....	62
XII.    Referencias .....	64
Apéndice A: Reactivos. ....	71

## I. ABREVIATURAS

**Células NK:** Células Natural Killer

**Células NKT:** Células Natural Killer T

**CFSE:** Succinimidil éster de carboxifluoresceína

**DCs:** Células Dendríticas

**DMEM:** Medio Eagle modificado por Dulbecco

**DNAM-1:** DNAX Accessory Molecule-1

**DP:** Dermis de placa psoriásica

**DS:** Dermis de piel sana

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

**HLA:** Antígeno leucocitario humano

**IDO:** Indolamina 2-3 dioxigenasa

**INF- $\gamma$ :** Interferón gama

**IL:** Interleucina

**IMSS:** Instituto Mexicano del Seguro Social

**ISSSTE:** Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

**KCs:** Queratinocitos

**KIR:** Receptores tipo inmunoglobulina de células Natural Killer

**KIR2DS1:** Receptor tipo inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios, cola citoplasmática corta, 1

**MIC:** secuencia relacionada al MHC-I

**MHC-I:** Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I

**$\mu$ l:** microlitro

**$\mu$ m:** micrometro

**μM:** micromol

**mg:** miligramo

**ml:** mililitro

**mm:** milimetro

**MO:** Médula ósea

**MSCs:** Células Estromales Mesenquimales

**NCR:** Receptor Citotóxico Natural

**Nectin-2:** Receptor 2 relacionado con el receptor de poliovirus

**ng:** nanogramos

**NO:** Óxido nítrico

**pDC:** Células Dendríticas plasmocitoides

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E2

**PSORS1:** Gen de susceptibilidad a psoriasis 1

**PVR:** Receptor del poliovirus

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**SNP:** Polimorfismo de Nucleótido Único

**TGF-β:** Factor de Crecimiento Transformante beta

**Th1:** Linfocitos T cooperadores 1

**Th17:** Linfocitos T cooperadores 17

**TNF-α:** Factor de Necrosis Tumoral-alfa

**ULBP:** Proteína de unión UL-16

**VEGF:** Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

## II. RESUMEN

La psoriasis es una enfermedad autoinmune y multifactorial que afecta la piel. En este tipo de enfermedad, las células inmunes presentes en las zonas de afección de dichos pacientes inducen una cascada de citocinas proinflamatorias que desencadenan un círculo de retroalimentación positiva para atraer a otras células inmunes que a su vez producen moléculas proinflamatorias y de adhesión endotelial, las cuales estimulan la migración adicional de nuevas células inmunes a dichas zonas de lesión, convirtiéndose así en un círculo de retroalimentación proinflamatorio. En particular, las células NK (por sus siglas en inglés *Natural Killer*) están presentes en las zonas de lesión (placas psoriásicas) y desempeñan un papel importante en la psoriasis al liberar citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , lo cual exacerba el microambiente proinflamatorio propio de la enfermedad.

Antecedentes relacionados con ello indican que las células estromales mesenquimales (MSCs, del inglés *Mesenchymal Stromal Cells*) provenientes de médula ósea (MO) tienen la capacidad de disminuir la proliferación y citotoxicidad de células NK. Más aún, recientemente nuestro grupo de investigación ha publicado estudios que demuestran la presencia de MSCs en la dermis de la piel de los pacientes con psoriasis y evidencian su participación en el desarrollo de la enfermedad, particularmente en su efecto inmunosupresor sobre los linfocitos T, en donde observamos baja capacidad inmunosupresora de dichas células en comparación con aquellas provenientes de MO. No obstante, a la fecha no hay estudios que demuestren si esta capacidad inmunosupresora deficiente sobre células T, también se presenta sobre células NK o alguna célula relacionada con la inmunidad innata en las MSCs de la dermis de las zonas afectadas de la piel de pacientes con psoriasis.

Con la idea de profundizar en los mecanismos inmunes que pueden participar en el desarrollo de la psoriasis, en este estudio comparamos la capacidad inmunosupresora de las MSCs provenientes de MO, dermis de donadores sanos

(DS) y dermis de las zonas lesionadas de los pacientes con psoriasis (DP), en términos de su efecto sobre las capacidades efectoras de las células NK (CD56<sup>+</sup>).

Nuestros resultados confirmaron el potencial inmunosupresor de MO-MSCs para disminuir la proliferación y citotoxicidad de células NK, tanto en co-cultivos en presencia y ausencia de contacto celular. Por su parte, determinamos que las MSCs de DS y DP tienen un bajo potencial para disminuir la proliferación de células NK, dado que en ausencia de contacto celular no mostraron dicha capacidad a diferencia de aquellas de MO. Más aún, esta capacidad deficiente de DS- y DP-MSCs para disminuir la proliferación, se observó sobre la subpoblación CD56<sup>Bright</sup> tanto en co-cultivos en presencia y ausencia de contacto celular. De manera interesante, únicamente en los co-cultivos con presencia de DP-MSCs se observó un aumento significativo de la citotoxicidad de las células NK. Nuestros resultados indican que las MSCs provenientes de DS y DP presentan capacidad deficiente para disminuir la proliferación de células NK, pero que solo las DP-MSCs incrementan la capacidad citotóxica de células NK. Lo anterior sugiere que las DP-MSCs pueden favorecer la inflamación crónica en la piel de los pacientes con psoriasis, dada su baja capacidad para disminuir la proliferación de las células NK, pero a la vez incrementando su capacidad citotóxica.

### **III. MARCO TEÓRICO**

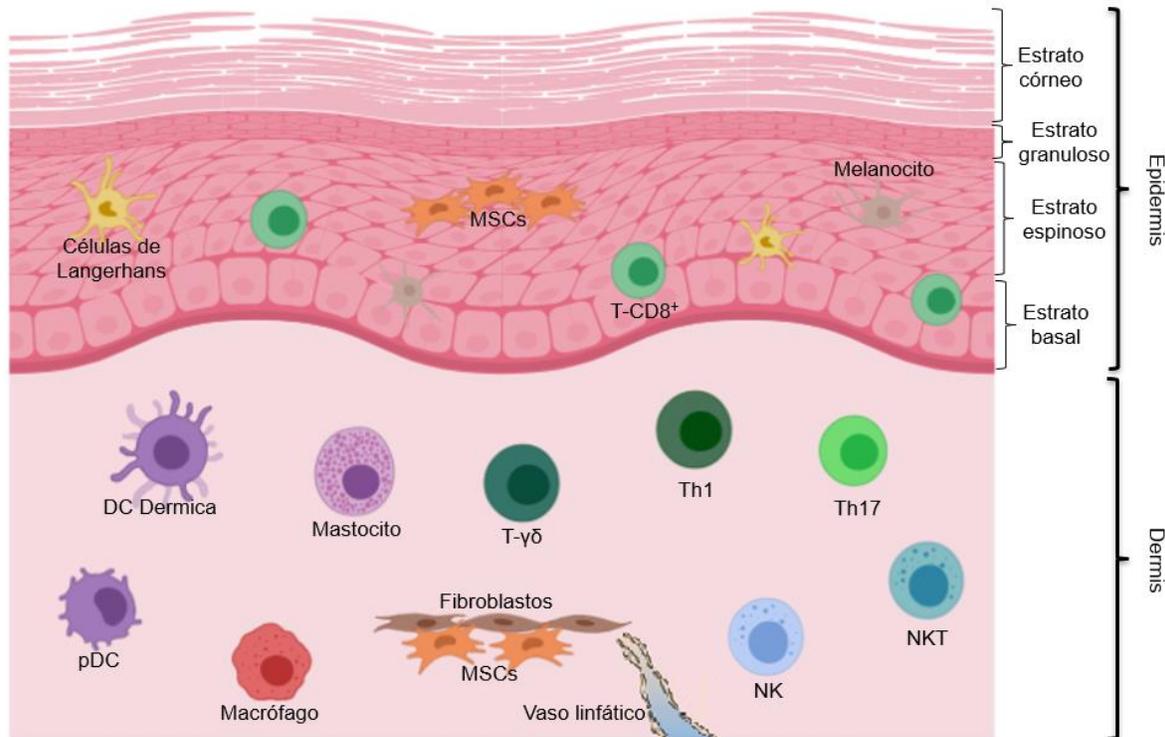
#### **1. La piel**

La piel conforma el revestimiento de la superficie externa del cuerpo, proporcionando una barrera protectora. Es el órgano más extenso del cuerpo humano, el cual tiene diversas funciones como asegurar la adecuada hidratación, protección de la radiación ultravioleta, regulación térmica, elemento de sensación y discriminación táctil, regulador de pH, resistencia al trauma mecánico y de irritantes, control de infecciones e inmunovigilancia (Visscher y Narendran, 2014; Di Meglio et al, 2011).

La capacidad única de la piel para llevar a cabo funciones múltiples está estrechamente relacionada con su estructura. La piel está compuesta de dos capas, la epidermis y la dermis, las cuales están separadas por una membrana basal constituida de proteínas de la matriz extracelular que incluyen la integrina y la laminina (Di Meglio et al, 2011; Visscher y Narendran, 2014).

## 1.1. Epidermis

La epidermis es el compartimento exterior y contiene cuatro estratos (figura 1) (Di Meglio et al, 2011). El estrato basal es la capa inferior de la epidermis y es responsable de renovar constantemente las células de la epidermis. Esta capa contiene solo una fila de células epidérmicas no diferenciadas, conocidas como queratinocitos (KC) basales, que se dividen con frecuencia. Los KCs basales se diferencian y se mueven a la siguiente capa, el estrato espinoso (también conocido como capa de células espinosas), en donde experimentan un proceso de maduración y se dividen para reponer la capa basal. Las células que se mueven en el estrato espinoso cambian de ser columnares a ser poligonales y comienzan a sintetizar queratinas que son distintas de las queratinas de la capa basal. Los KCs en el estrato granuloso se caracterizan por grupos oscuros de material citoplásmico y estas células producen de forma activa las proteínas y los lípidos. El estrato córneo, como el producto final de los KCs de maduración, es el más externo de los cuatro estratos de la epidermis y es en gran parte responsable de la función de barrera de la piel. Las células en esta capa, conocidas como corneocitos, son células derivadas de KCs muertos que están desprovistas de orgánulos. Proporcionan la barrera que excluye muchos agentes tóxicos y previene la deshidratación (Nestle et al, 2009a).



**Figura 1. Anatomía de la piel y efectores celulares.** La epidermis contiene el estrato basal, el estrato espinoso, el estrato granuloso y el estrato córneo. Las células especializadas en la epidermis incluyen los melanocitos, células de Langerhans, pocos linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>. La dermis contiene muchas células especializadas, como linfocitos T CD4<sup>+</sup> como Th1 y Th17, linfocitos T γδ y células NK y NKT. Además, DC dérmicas y pDC macrófagos, mastocitos, fibroblastos y MSCs.

Las células especializadas de la epidermis incluyen los melanocitos, que producen el pigmento melanina y las células de Langerhans, que son la principal célula inmunitaria que reside en esta capa. Además, las células T, principalmente las células T CD8<sup>+</sup>, se pueden encontrar en el estrato basal y el estrato espinoso (Nestle et al, 2009a) (figura 1). También esta capa, aloja células de terminaciones nerviosas (células de Merkel), esenciales para el tacto ligero y la discriminación de formas y texturas (Di Meglio et al, 2011).

## **1.2. Dermis**

La dermis está debajo de la epidermis y se deriva del mesodermo. Tiene mayor diversidad celular, proporciona una estructura mecánica a través de una red de tejido conectivo, que incluye las proteínas colágeno y elastina. Los folículos pilosos, las glándulas sebáceas, los nervios sensoriales y vasculatura están dentro de la Dermis (Visscher y Narendran, 2014). Se compone de una dermis papilar superior (estrato papila) y reticular inferior (estrato reticular) que contiene fibras de colágeno finas y gruesas, respectivamente (Di Meglio et al, 2011). Las fibras de colágeno ofrecen una barrera mecánica, así como un marco estructural en el que se albergan los vasos sanguíneos y muchas células inmunes como las células dendríticas dérmicas (DC dérmica), detriticas plasmocitoides (pDC), los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, linfocitos T  $\gamma\delta$ , las células NK, células NKT y células B; además, también están presentes macrófagos, mastocitos y fibroblastos. La dermis es drenada por conductos linfáticos y vasculares, a través de los cuales las células migratorias pueden transitar (figura 1) (Di Meglio et al, 2011; Nestle et al, 2009a).

## **1.3. Sistema inmunitario de la piel.**

La piel tiene un sistema versátil bien coordinado de células epiteliales e inmunitarias, que en conjunto aseguran respuestas inmunitarias adecuadas contra traumas,

toxinas e infecciones, al tiempo que mantiene la auto-tolerancia, previene las alergias e inhibe la autoinmunidad (Di Meglio et al, 2011).

Una extensa interrelación entre las zonas epiteliales, estromales y células inmunocompetentes, regulan las respuestas inmunes en la piel para garantizar una defensa eficaz del huésped y mantener o restaurar homeostasis tisular. La piel está dotada de centinelas inmunes y células efectoras que recirculan a través del drenaje de ganglios linfáticos en la piel y son capaces de reaccionar rápidamente a la invasión de patógenos. Estos linfocitos circulantes se dirigen tanto a la piel, como a otros órganos periféricos como los pulmones o el intestino, ello para mantener vigilancia inmunológica. La piel sana en individuos normales presenta un número significativo de células inmunes, este número se extravasa cuando son encontradas señales de peligro en el endotelio microvascular (Di Meglio et al, 2011; Boyman et al, 2005).

Las células NK de dermis sana representan un 10% aproximadamente entre los leucocitos CD45<sup>+</sup>. Estas células carecen del marcador CD16 y no muestran capacidad de lisis inmediata de células diana, necesitando una pre-activación para cumplir esta función (Ebert et al, 2016).

El enfoque clásico para estudiar la respuesta inmune se ha centrado en los componentes celulares y moleculares individuales de la inmunidad innata y adaptativa, descuidando en gran medida la contribución del estroma a la inmunidad del tejido. Sin embargo, ahora es claro que para comprender los mecanismos que regulan la inmunidad, se requieren el estudio de las interacciones entre los diferentes componentes celulares inmunes y no inmunes de tejidos específicos. La homeostasis

en la piel se basa en un equilibrio finamente sincronizado de interacciones bien reguladas entre diferentes componentes celulares y microbianos; la desregulación de este equilibrio contribuye a la patogénesis de enfermedades inflamatorias de la piel como la psoriasis (Pasparakis et al, 2014).

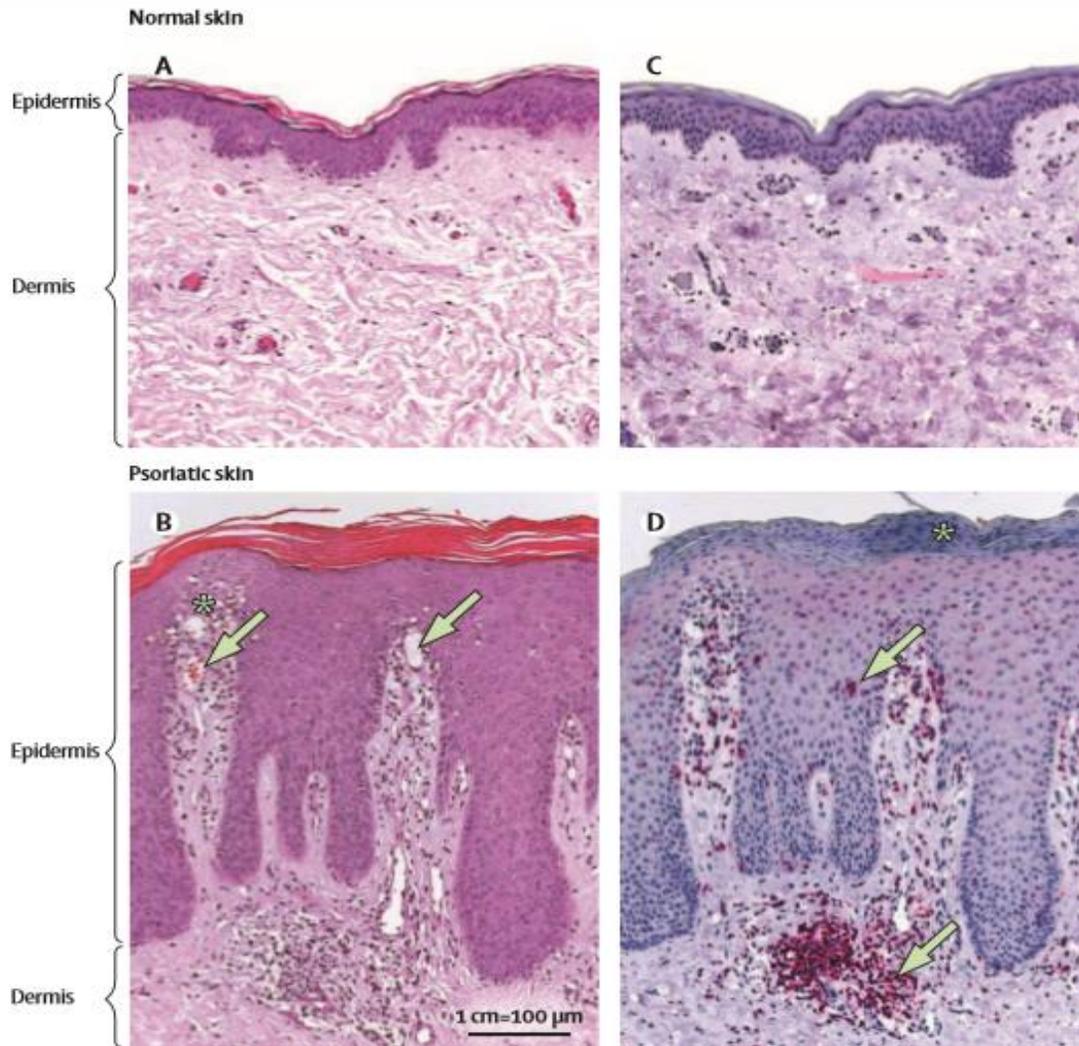
## 2. Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad crónica que ocurre con mayor frecuencia en edad avanzada, la prevalencia en adultos varía del 1% al 12% (dependiendo del grupo étnico) y en niños es del 0-2% (Michalek et al, 2016). Esta enfermedad afecta a aproximadamente 125 millones de personas en todo el mundo (International Federation of Psoriasis Associations, 2015).

Cinco tipos de psoriasis se han reportado: psoriasis en placas (también conocido como psoriasis vulgaris), la cual es la forma más común y representa el 90% de los casos; gota o psoriasis eruptiva, que se caracteriza por escamas-manchas en forma de lágrima o gota y ocurre en aproximadamente 9% de los pacientes; psoriasis inversa, también llamada psoriasis intertriginosa o flexural que generalmente se encuentra en pliegues de piel; psoriasis pustulosa, que puede tomar la forma de pustulosis palmoplantar (psoriasis postular de las palmas y las plantas de los pies), o psoriasis pustulosa generalizada (una forma rara y grave de psoriasis); y psoriasis eritrodérmica, que es una variedad rara pero muy grave de la psoriasis que afecta la superficie del todo el cuerpo (Boehncke y Schön 2015). Una proporción de pacientes con psoriasis desarrollará artritis psoriásica (Lowe et al, 2014).

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria de la piel mediada por el sistema inmune, clínicamente caracterizada por placas escamosas altamente inflamadas y claramente desarticuladas (Nestle et al, 2009b). Las características histológicas de

la psoriasis consisten en una hiperplasia epidérmica marcada con diferenciación de KCs desregulada, infiltrado inflamatorio prominente en la dermis compuesto principalmente por linfocitos T y DCs; en la epidermis por neutrófilos; también hay presencia de vascularización aumentada (figura 2). Una combinación de factores ambientales (faringitis estreptocócica, estrés, traumatismo de la piel y ciertos fármacos) y genéticos (variantes genéticas que confieren susceptibilidad a la enfermedad), desencadenan los cambios inmunohistológicos que se observan en la piel (Alwan y Nestle, 2015; Boehncke y Schön, 2015; Di Meglio et al, 2011; Mak et al, 2009; Nestle et al, 2009b)



**Figura 2. Características histopatológicas de la psoriasis.** Dentro de la placa típica, la epidermis psoriásica muestra un engrosamiento, hiperqueratosis y alargamiento de crestas de rete. A) Piel normal y B) Piel lesionada de psoriasis; teñida con hematoxilina y eosina. Los vasos sanguíneos dérmicos se encuentran dilatados (B, flechas). Se observa celularidad inflamatoria mixta, con infiltrado de neutrófilos acumulados dentro de la epidermis (B, asterisco). La detección inmunohistoquímica de CD3 en C) piel sana y D) Piel lesionada de psoriasis, revela muchas células T en la dermis y la epidermis de la lesión psoriásica (flechas). Los núcleos celulares presentes en la capa cornificada de la epidermis, también son característicos de la lesión en piel psoriásica (D, asterisco). (Tomado de Boehncke y Schön, 2015).

## 2.1. Inmunopatogénesis de la psoriasis

La psoriasis está dentro del espectro de las enfermedades inflamatorias de tipo autoinmune, surge como resultado de interacciones desreguladas del sistema inmune innato y adaptativo en el contexto del epitelio cutáneo y el tejido conectivo. Las células inmunes innatas inducen una cascada de citocinas proinflamatorias, que conduce a la proliferación epidérmica aberrante característica de la psoriasis (Alwan W y Nestle FO, 2015; Di Meglio et al, 2011).

Las células inmunes innatas son posibles iniciadores de la cascada inflamatoria, entre ellas las pDCs al liberar interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que actúan mediante la activación de células presentadoras de antígeno dendrítico mielóide. Los KCs son capaces de producir citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), así como péptidos antimicrobianos y quimiocinas que pueden estimular la migración de células inmunes a la piel. Las células inmunes innatas inician una cascada de citocinas proinflamatorias, entre ellos, los macrófagos y las células NK proporcionan estímulos proinflamatorios a través de la secreción de citocinas (Alwan y Nestle, 2015).

Las células DC activadas actúan como presentadoras de antígenos y secretan citocinas como IL-12 e IL-23, que conducen a la proliferación y diferenciación de los linfocitos T en células cooperadores T tipo 1 (Th1) y tipo 17 (Th17). Los linfocitos Th17 y Th1 activan a los KCs que a su vez pueden reclutar y activar nuevamente a las mismas células. Esta cascada inflamatoria conduce a la

proliferación de KCs, la producción de péptidos antimicrobianos, quimiocinas y de citocinas proinflamatorias, lo cual en conjunto regula a la baja la expresión de genes de diferenciación de dichos KCs y participa en la hiperplasia de los mismos (Alwan y Nestle, 2015).

Existe un circuito de retroalimentación positiva para atraer a otras células inmunes innatas y adaptativas para seguir controlando el proceso inflamatorio, hay una activación constante de KCs mediadores de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , de macrófagos que contribuyen con la secreción de más TNF- $\alpha$ , de células NK productoras de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y de células NKT que producen IL-17 e IL-22. La cascada inflamatoria también activa mediadores de la angiogénesis e induce moléculas de adhesión endotelial que estimulan la migración adicional de células inmunes hacia las zonas de lesiones psoriásicas (Alwan y Nestle, 2015).

Se han realizado varios estudios genéticos, en los cuales, han sugerido que ningún locus genético causa psoriasis, sino que varios loci pueden contribuir al fenotipo de la psoriasis. La asociación más significativa ha sido en la región del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) del cromosoma 6 que incluye los genes del antígeno leucocitario humano (HLA) HLA-A, -B, -C y HLA-E. Por lo tanto, la psoriasis es una enfermedad genética compleja. Los datos sugieren que los SNP (Polimorfismo de Nucleótido Único) asociados con la psoriasis en esta región están más cerca del gen HLA-C y un análisis posterior a nivel de alelo, sugirió que los alelos SNP asociados se correlacionan fuertemente con HLA-Cw6, esta región, también conocida como PSORS1, es el vínculo genético más relacionado con la psoriasis de inicio temprano (presente en el 90% de los paciente), confiriendo

más del 50% de susceptibilidad a la psoriasis, la cual se observa en hasta el 60% de los pacientes con esta enfermedad en comparación con el 15% en la población general (Alwan y Nestle, 2015; Chen y Tsai, 2018; Harden et al 2015; Mak et al, 2009; Dunphy y Gardiner, 2011).

### 3. Células NK

Las células NK son linfocitos granulares, que tradicionalmente se identifican como parte del sistema inmunitario innato, participan en la defensa temprana contra células extrañas y células autólogas que sufren diversas formas de estrés, como infección viral o transformación tumoral, además, las células NK pueden responder a citocinas como la interleucina IL-2 e IL-15 (Mendoza-Rincón, 2004; O'Connor et al, 2006; Spaggiari y Morretta, 2013; Walzer et al, 2005). Al reconocer su objetivo o al activarse con citocinas, las células NK proliferan, aumentan la secreción de citocinas y aumentan su capacidad de citotoxicidad (O'Connor et al, 2006; Walzer et al, 2005). Las células NK tienen un papel en la regulación de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa (Spaggiari y Morretta, 2013).

Hay dos variantes de células NK, las CD56<sup>Dim</sup> y las CD56<sup>Bright</sup>, las cuales tienen diferentes funciones en la inmunidad innata. Las células CD56<sup>Dim</sup> en la sangre periférica constituyen el 90% de todas las células NK, estas se encuentran en estadio maduro y son las principales responsables de las respuestas de citotoxicidad. En contraste, las células CD56<sup>bright</sup> predominan en los ganglios linfáticos representan el 75% de células NK, participan en la respuesta inflamatoria produciendo citocinas como el IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y algunas quimiocinas. Este tipo de células NK en particular, cuentan con pocas funciones citotóxicas y se conocen por tener un fenotipo inmaduro (Mendoza-Rincón, 2004; Suen et al, 2018 y Toubin y Vadasz, 2019).

Las células NK citotóxicas tras su activación inducen apoptosis de células reconocidas como dianas, mediante procesos de exocitosis de perforinas y

granzimas. Las células NK identifican sus dianas a través de un conjunto de receptores activadores o inhibidores, que reconocen moléculas codificadas por patógenos ("reconocimiento no propio"), proteínas propias cuya expresión está regulada positivamente en células transformadas o infectadas ("inducida por estrés" o de "auto-reconocimiento") o auto-proteínas que son expresadas por células normales pero reguladas a la baja por células infectadas o transformadas ("auto-reconocimiento faltante"). Las células NK, en contraste a los linfocitos T y B, no reconocen los antígenos extraños, sino que detectan cambios en las moléculas propias que se muestran en la superficie de las células autólogas. La activación de las células NK es controlada por el equilibrio dinámico entre estos activadores e inhibidores de señales (Walzer et al, 2005).

El reconocimiento de objetivos apropiados es un paso fundamental en este proceso. Las células NK tienen receptores activadores convencionales, también expresan más inusualmente receptores inhibitorios constitutivamente activos. Parece que la suma neta de inhibición y la señalización de activación controla en última instancia la función de la célula NK. Los receptores de células NK se dividen en dos principales categorías, de acuerdo con su estructura: 1) receptores de lectina tipo C y 2) receptores tipo inmunoglobulina (Mendoza-Rincón, 2004; O'Connor et al, 2006; Torres-García et al, 2008).

La función de los receptores tipo inmunoglobulina (KIR, del inglés *killer immunoglobulin-like receptor*) de células NK es el reconocimiento e interacción con moléculas clásicas MHC-I, en humanos son conocidas como moléculas HLA-I. La interacción KIR con sus ligantes HLA, resulta en una inhibición o activación de los

mecanismos efectores de las células NK sobre una célula blanco (Mendoza-Rincón, 2004; O'Connor et al, 2006; Torres-Garcia et al, 2008).

En ciertas condiciones patológicas, el nivel de expresión de moléculas MHC-I se ve alterado, como en aquellas provocadas por infecciones virales o procesos de carcinogénesis, esto provoca una activación de las células NK vía señalización por KIR. La actividad resultante es la citotoxicidad y la producción de citocinas por parte de la célula NK (Mendoza-Rincón, 2004; O'Connor et al, 2006; Torres-García et al, 2008).

La otra clase de receptores en células NK son los CD94/NKG2, que pertenecen a la familia de receptores de tipo lectina C, reconoce a MHC-I no clásicas (HLA-E). HLA-E se une y presenta el péptido líder de la mayoría de las moléculas HLA-A, -B y -C, así como la molécula HLA-G no clásica. Por lo tanto, mientras que los KIR son sensibles a los cambios individuales de alelos HLA, son complementado funcionalmente por CD94 / NKG2, que responde a los cambios en la expresión global de HLA. Esto permite a las células NK responder a las alteraciones sutiles y mayores en expresión de HLA causada por diferentes situaciones patológicas. (O'Connor et al, 2006). La familia CD94 / NKG2 incluye seis miembros: NKG2A, B, C, D, E y F. Los receptores NKG2A y NKG2B transmiten una señal inhibitoria, mientras NKG2C, NKG2E Y NKG2F son receptores activadores. (Mendoza-Rincón, 2004)

El receptor NKG2D también es un receptor activador de tipo lectina C, pero este tiene poca relación a los demás receptores de este tipo. El receptor NKG2D tiene como ligandos varios grupos de proteínas que guardan una semejanza con las

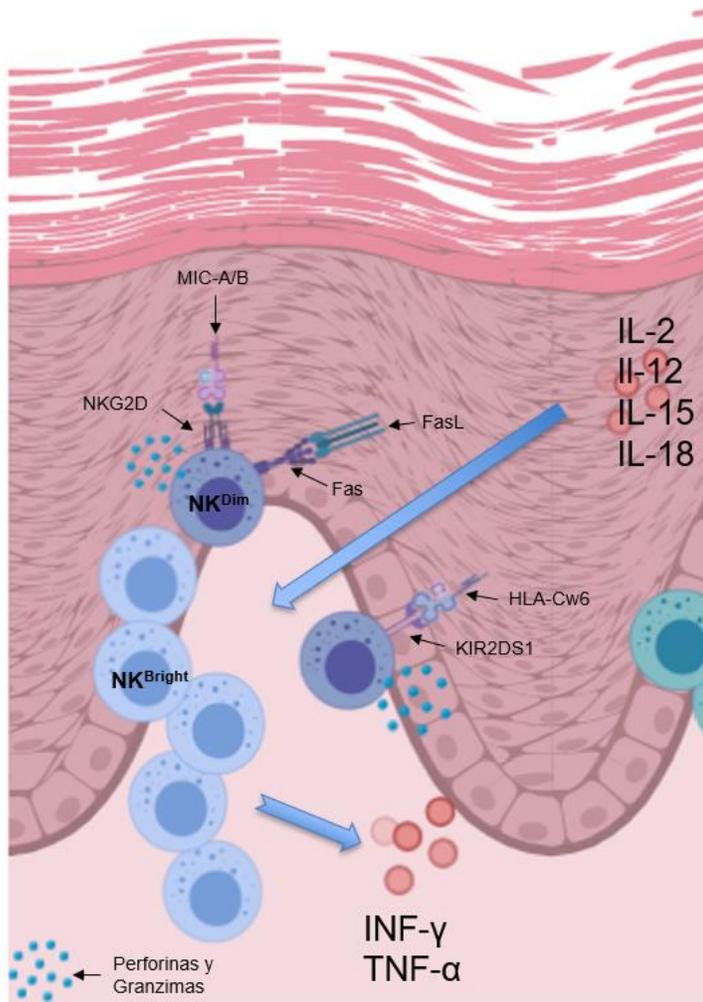
proteínas del MHC-I, las cuales se encuentran presentes en células tumorales, células infectadas por virus y en células bajo condiciones de estrés, estos ligandos son MIC-A (MIC del inglés *MHC class I-related*), MIC-B y ULBP (del inglés *UL16 binding protein*) (Mendoza-Rincón, 2004).

Existen otra clase de receptores como los receptores citotóxicos naturales (NCR) que no reconocen a los ligandos HLA-I, sin embargo, también tienen la capacidad de activar e inhibir a las células NK en ausencia de estímulos adicionales (Mendoza-Rincon, 2004; O'Connor et al, 2006).

#### 4. NK en el desarrollo de la psoriasis

Las células NK constituyen una subpoblación de células del sistema inmune que aumentan significativamente en la piel con lesiones psoriásicas y que se han relacionado con la patogénesis de esta enfermedad (Lowes et al, 2014; Chiricozzi et al, 2018). Las células NK constituyen del 5% al 8% del infiltrado celular de la psoriasis en la dermis y de estas células que expresan el fenotipo CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> la mayoría son del subtipo CD56<sup>Bright</sup> que liberan altas cantidades de INF- $\gamma$ , ayudando así a activar las funciones inflamatorias de lo KCs (Ottaviani et al, 2005). También se ha encontrado que perforinas y granzimas se encuentran en niveles más altos en la piel con lesión psoriásica que en la piel de pacientes con psoriasis donde no hay lesión y en la piel sana, sugiriendo una alta actividad citotóxica (Dunphy y Gardiner, 2011). Además, las citocinas activadoras de células NK como IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 se encuentran en niveles aumentados en las placas psoriásicas (Mak et al, 2009; Dunphy y Gardiner, 2011) (figura 3).

Las células NK participan en la inflamación de la psoriasis mediante la liberación de citocinas tales como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y algunas poblaciones IL-22, las cuales juegan un papel crucial en el desarrollo de la psoriasis. Es importante destacar que el tratamiento ex vivo con IL-22 da como resultado el desarrollo de características psoriásicas que incluyen hiperplasia, paraqueratosis, proyecciones epidérmicas descendentes y acantosis (Dunphy y Gardiner, 2011; Chiricozzi et al, 2018).



**Figura 3. Participación de células NK en la Psoriasis.**

Las citocinas inflamatorias IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18, activan a las células NK. Los queratinocitos también pueden presentar ligandos activadores de células NK como HLA-Cw6, MIC A/B y Fas. Las células NK aumentan su citotoxicidad, su población NK<sup>Bright</sup> también aumenta y producen altas cantidades de citocinas, como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

Se ha observado que los queratinocitos secretan quimiocinas que atraen a las células NK como CXCL10, CCL5 y CCL20. De hecho, los receptores para estas quimiocinas se identificaron en las células NK que se encuentran en la piel psoriásica, con altos niveles de expresión de CXCR3 y CCR5 (receptores para CXCL10 y CCL5, respectivamente) y niveles moderados de CCR6 (receptor de CCL20), lo que facilita su reclutamiento en la piel afectada. Aunque está claro que estas células pueden contribuir a la inflamación, sus funciones en esta enfermedad aún no se conocen completamente (Dunphy y Gardiner, 2011; Lowes et al, 2014;

Chiricozzi et al, 2018).

También se conoce que las células NK pueden interactuar con los KCs a través de una gama de receptores de la superficie celular, entre estos receptores se encuentra los receptores de activación NKG2D que reconoce el antígeno de estrés MIC-A/B y el receptor Fas que puede activar la secreción de citocinas por las células NK. El receptor activador KIR2DS1 (y su contraparte inhibitoria, KI-R2DL1) se une a la molécula HLA-Cw6 (Dunphy y Gardiner, 2011) (figura 3).

## 5. Células Estromales Mesenquimales (MSCs)

Las MSCs son células multipotentes adherentes al plástico con morfología fibroblastoide y que pueden diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Además, se pueden definir de acuerdo con su falta de marcadores hematopoyéticos y endoteliales CD34, CD45, CD11b, CD14, HLA-DR y la expresión positiva de los marcadores CD73, CD90 y CD105 (Dominici et al, 2006).

Las MSCs se aislaron por primera vez de MO (Friedenstein et al, 1974), sin embargo, actualmente se ha demostrado su presencia en diferentes tejidos, tanto adultos (tejido graso y dental) como neonatales (placenta y cordón umbilical). Se ha observado que las MSCs de dichas fuentes, presentan potenciales distintos de diferenciación, expresión inmunofenotípica, capacidad proliferativa y de inmunoregulación, lo cual depende del tejido del que se aíslan (Castro-Manrreza et al, 2014; Montesinos et al, 2009).

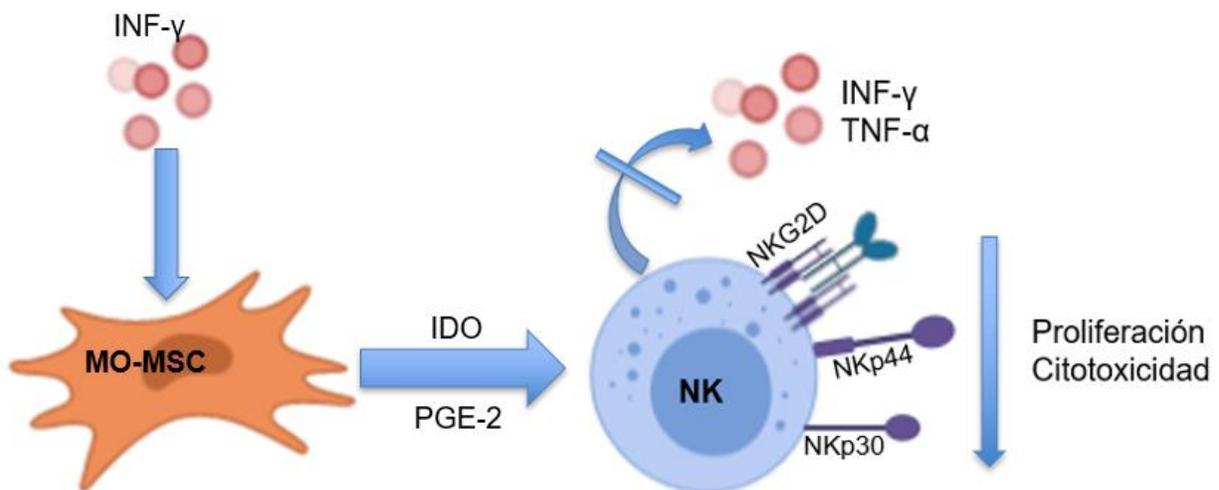
Se ha demostrado que las MSCs tienen efectos inmunomoduladores, como la inhibición de la proliferación de linfocitos T activados y células NK, modulación de la producción de citocinas inflamatorias y quimiocinas por las células dendríticas y macrófagos, inhibición de la maduración de células dendríticas, supresión de la proliferación y producción de inmunoglobulinas de las células B e inhibición de la actividad citotóxica de las células NK (Castro-Manrreza y Montesinos, 2015).

### 5.1. Inmunomodulación sobre células NK

Se ha demostrado que las MSCs provenientes de la MO, pueden afectar el fenotipo, la proliferación, el potencial citotóxico y la secreción de citocinas de las células NK (Sotiropoulou et al, 2006; Spaggiari et al, 2006; Spaggiari et al, 2008). Al ser inducidas con citocinas como la IL-2 y la IL-15, las células NK se activan, proliferan y producen citocinas como INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , sin embargo, en presencia de MSCs de MO, la proliferación y las citocinas liberadas por estas células disminuye (Sotiropoulou et al, 2006; Spaggiari et al, 2008). Estudios recientes sugieren que los efectos de las MSCs sobre las células NK pueden diferir, dependiendo de la citocina con que se estimula a la célula NK (Najar et al, 2018; Najar et al, 2017).

En experimentos *in vitro*, la inducción de la citotoxicidad NK también disminuye debido a la presencia de MSCs, no obstante, en este caso es necesario el contacto célula-célula (Sotiropoulou et al, 2006). Por su parte, también se ha demostrado que las MSCs inhiben la expresión de NKp44, NKp30 y NKG2D, receptores de activación de las funciones efectoras de las células NK (Spaggiari et al, 2008). Este efecto se la ha atribuido a la secreción de factores solubles por las MSCs comoIDO (Indoleamina 2,3-dioxigenasa) y la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), ya que dicho efecto se observó en ausencia de contacto celular (Sotiropoulou et al, 2006). Una restauración parcial pero significativa de la proliferación de células NK y citotoxicidad se observó cuando se inhibió la síntesis de PGE<sub>2</sub>, sugiriendo que PGE<sub>2</sub> está involucrada en el efecto inhibitorio (Sotiropoulou et al, 2006). De igual manera se ha observado que el bloqueo de la actividad de la enzima IDO puede restaurar

significativamente la proliferación de las células NK (Spaggiari et al, 2008). De manera interesante se ha demostrado que la presencia simultánea de inhibidores de PGE<sub>2</sub> e IDO en co-cultivos de NK con MSC-MO, restaura casi completamente tanto la proliferación como la citotoxicidad de las células NK. Estos datos indican que PGE<sub>2</sub> e IDO son fundamentales mediadores del efecto inhibitorio mediado por MSCs en células NK. En particular, PGE<sub>2</sub> es producida constitutivamente por MSCs, mientras que IDO se expresa de novo tras la exposición celular a IFN- $\gamma$  (Spaggiari y Moretta, 2012). En otro estudio se observó que la neutralización de IFN- $\gamma$  producida por las células NK, parcialmente restaura la proliferación de las células NK en co-cultivo con MSCs (Krampera et al, 2009) (figura 4).



**Figura 4. Inmunomodulación de MO-MSCs hacia células NK.** Las MO-MSCs, en presencia de IFN- $\gamma$ , aumentan la producción de PGE<sub>2</sub> e IDO, estas actúan de forma sinérgica para inhibir la proliferación de células NK, disminuyen su producción de citocinas y de receptores activadores, afectando su función citotóxica

De igual manera se sabe que durante las interacciones de NK y MSCs, las células NK rápidamente secretan IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , que a su vez, incrementan la producción de PGE<sub>2</sub> y la síntesis deIDO por parte de las MSCs. Con lo anterior se ha establecido que IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , representan factores cruciales para la inducción de la actividad inmunorreguladora mediada por las MSCs (Spaggiari y Moretta, 2012).

Las MSCs también expresan algunos ligandos de receptores NK activadores, incluidos ULBP1–4 y MIC-A/B que se unen a NKG2D y los ligandos de PVR y Nectin-2, que activan a DNAM-1, lo cual las hace susceptibles a ser lisadas por células NK estimuladas por citocinas activadoras (Spaggiari et al, 2006); las células NK en reposo recién aisladas no lisan MSCs (Poggi et al, 2005; Sotiropoulou et al, 2006). El bloqueo de los receptores NKp30, NKG2D y DNAM-1 inhiben este efecto (Spaggiari et al, 2008).

Actualmente, se ha demostrado la capacidad inmunoreguladora de las MSCs de dermis. En un estudio con DS-MSCs provenientes de prepucio humano se comprobó que disminuyen la proliferación de células NK, no obstante, estas a su vez también son capaces de lisar a las DS-MSCs. Se observó la expresión constitutiva de los ligandos Nectin-2 y PVR en DS-MSCs, sin embargo, la expresión de ULBP3 fue muy baja. De manera interesante la producción de citocinas como TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  aumentaron en co-cultivos de NK y MSCs; ambos factores activan la capacidad inmunosupresora de las MSCs. De igual manera, en este estudio se demostró que la expresión de receptores KIR y NKG2D depende de citocinas que activan a la célula NK (IL-2, IL-12, IL-15 o IL-18), lo cual repercute en la interacción NK-MSCs. En general, las DS-MSCs disminuyeron la expresión de los receptores

de activación presentes en la membrana de las células NK (Najar et al, 2017).

## **5.2. MSCs provenientes de la dermis de pacientes con Psoriasis**

Estudios en nuestro laboratorio han evidenciado la presencia de MSCs en las dos capas que constituyen a la piel (dermis y epidermis), tanto en donadores sanos como en pacientes con psoriasis. En estos estudios se demostró que las MSCs de dermis psoriásica poseen baja capacidad de inmunosupresión de células T, además muestran una alta expresión de HLA-I en comparación con aquellas MSCs provenientes de la dermis de donadores sanos (figura 5) (Castro-Manrreza et al 2019; Cortés-Morales, Tesis de Maestría, 2018).

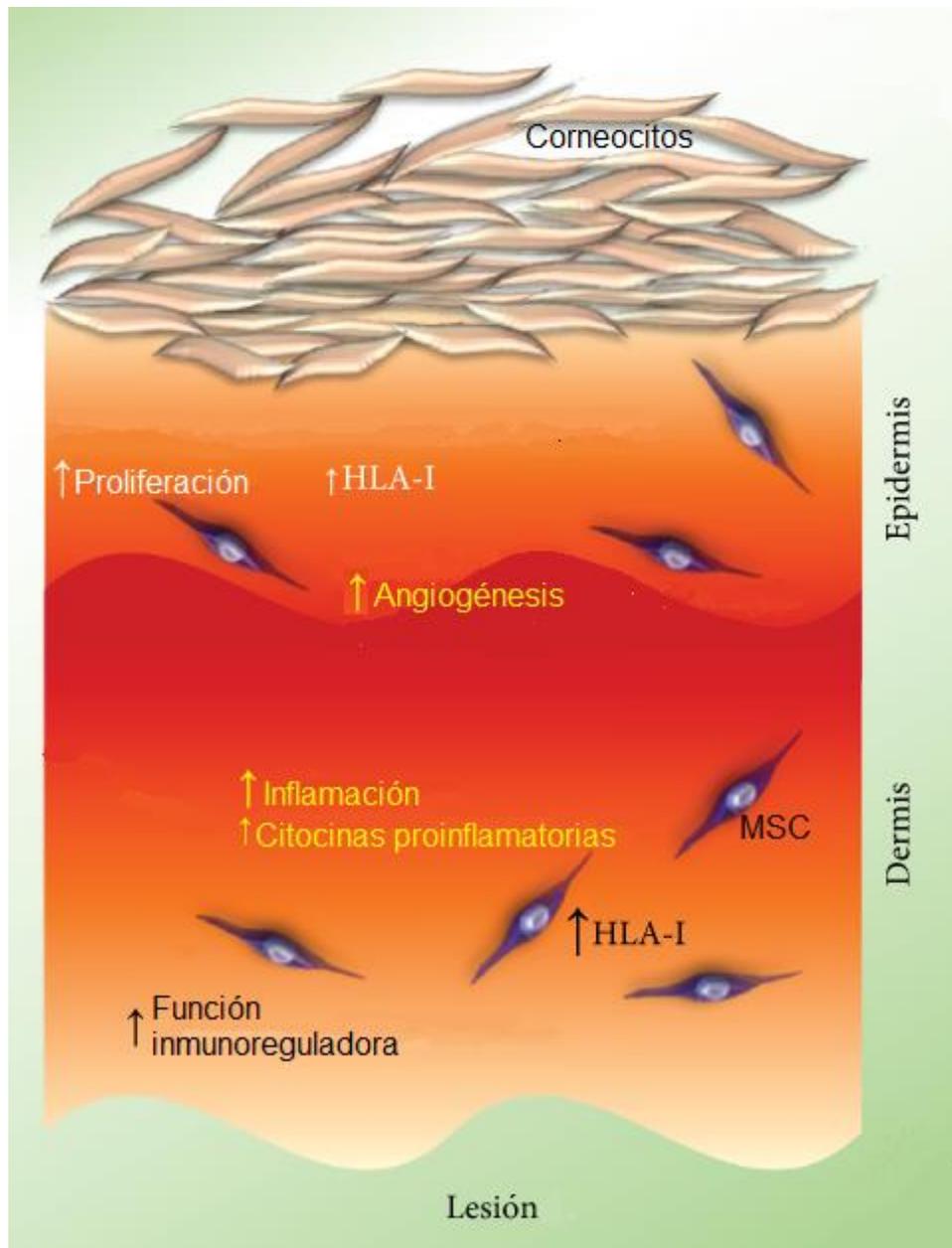
Otros grupos de investigación han publicado que las MSCs dérmicas presentes en las zonas con lesiones psoriásicas, tienen una alta capacidad para favorecer la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) (figura 5); la proliferación excesiva de los capilares es una de las características patológicas de la psoriasis. Al comparar MSCs de piel sanas y MSCs de lesión psoriásica, descubrieron que estas últimas secretan en exceso factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y Óxido nítrico (NO) (Orciani et al, 2011).

De igual manera, se ha demostrado que las MSCs de piel de lesión psoriásica tienen la capacidad de expresar citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-17, IL-21, IL-23 y algunas quimiocinas, lo cual sugiere que las MSCs residentes en lesiones psoriásicas pueden promover la inflamación local

(Campanati et al, 2014). Se ha observado que dichas citocinas, de manera similar a las citocinas pro-angiogénicas y el inhibidor de TNF- $\alpha$ , también pueden promover el desequilibrio patológico de Th1 y Th17. Estas observaciones sugieren que las MSCs residentes en las lesiones psoriásicas pueden promover la inflamación local (Hou et al, 2016) (figura 5).

Las MSCs pueden inhibir la activación y proliferación de la mayoría de las células inmunes debido en parte a las citocinas antiinflamatorias que secretan, como el TGF- $\beta$ , IL-10, IDO, PGE<sub>2</sub> y NO. Sin embargo, también se ha descrito que las MSCs pueden presentar un fenotipo pro-inflamatorio, liberando quimio-atrayentes y factores estimulantes de diversas células inmunes (Hou et al, 2016).

Así, la infiltración celular inflamatoria, la angiogénesis en la papila dérmica y la respuesta inmune no restringida, son las principales características patogénicas de la psoriasis. En este contexto, hay evidencias que sugieren que las MSCs presentes en la dermis de los pacientes con psoriasis están involucradas en su patogenia, de acuerdo con los antecedentes mencionados, sin embargo, el efecto inmunosupresor de las MSCs de la dermis de dichos pacientes sobre las células NK, no se conoce actualmente.



**Figura 5. Las MSCs derivadas de la piel de pacientes con psoriasis muestran alteraciones biológicas.** La presencia de MSCs en la dermis y epidermis lesionada de pacientes con psoriasis, podría contribuir a la expansión y diferenciación incompleta de las células epidérmicas. Además, debido a su baja capacidad inmunosupresora, también podrían favorecer el mantenimiento de estas lesiones. Las MSCs presentan una alta expresión de HLA-I lo que podría favorecer el desarrollo de lesiones psoriásicas. Por su parte, la inflamación exacerbada en las áreas lesionadas favorecería el reclutamiento de MSCs y su activación (Modificada de Castro-Manreza et al, 2019).

## **IV. Planteamiento del problema**

La psoriasis afecta entre el 2 y el 3% de la población mundial y se manifiesta en la mayor parte de los casos como psoriasis en placas, también llamada psoriasis vulgar; en México se calcula que existen aproximadamente 2 millones de pacientes con psoriasis, de los cuales se desconoce la cifra exacta de los casos con formas moderadas a severas. Asimismo, no se cuenta con estadística publicada de los pacientes que reciben tratamiento sistémico. Por lo cual la psoriasis representa un importante desafío para la salud pública (Estrada-Aguilar et al, 2015)

Aún no se conocen los factores específicos que desencadenan esta enfermedad autoinmune caracterizada por inflamación crónica, particularmente en diferentes zonas de la piel. Existen varias alternativas para tratar la psoriasis, como son: tratamientos tópicos, fototerapia, medicamentos orales o inyectables (principalmente inhibidores del sistema inmune), sin embargo, aún no existe una terapia que solucione de forma definitiva la enfermedad, debido a ello es necesario conocer a profundidad su biología para establecer futuros tratamientos. Al respecto, estudios recientes sugieren que las MSCs dérmicas pueden participar en el desarrollo de esta enfermedad, mediante su interacción con células del sistema inmune. Conocer las funciones biológicas de las MSCs en la psoriasis, además de ayudar a entender mejor la enfermedad, podría ofrecer una nueva alternativa de terapia celular para tratar esta patología.

Nuestro grupo de investigación en trabajos previos ha demostrado la

presencia de MSCs en la dermis de pacientes con psoriasis con baja capacidad de inmunosupresión sobre linfocitos T, ello al ser comparadas con MSCs provenientes de la dermis de donadores sanos (Castro-Manrreza et al, 2019; Cortés-Morales, Tesis de Maestría, 2018). Dicha capacidad disminuida, de las MSCs de pacientes con psoriasis, puede favorecer la baja respuesta anti-inflamatoria observada en las zonas de lesión y con ello el desarrollo de la patología. En este estudio se pretende profundizar en el conocimiento de la biología de las MSCs provenientes de pacientes con psoriasis, específicamente en su capacidad de inmunosupresión sobre la proliferación y capacidad citotóxica de las células NK, ello con la idea que a futuro se puedan emplear estas células en procedimientos de terapia celular para mejorar la condición de estos pacientes.

## **V. Hipótesis**

Las MSCs provenientes de la dermis de las zonas lesionadas de pacientes con psoriasis, tendrán disminuida la capacidad de inmunosupresión sobre las células NK, particularmente para disminuir su proliferación y capacidad citotóxica, ello en comparación con aquellas MSCs provenientes de la dermis de donadores sanos.

## **VI. Objetivos**

### **1. Objetivo general**

Determinar la capacidad inmunosupresora de células estromales mesenquimales provenientes de la dermis de pacientes con psoriasis sobre la proliferación y capacidad citotóxica de las células NK.

### **2. Objetivos particulares**

- Evaluar la proliferación de las células NK (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) activadas, en co-cultivos en presencia de MO-MSCs, DS-MSCs y DP-MSCs.
- Evaluar la proliferación de las subpoblaciones de células NK CD56<sup>Bright</sup> y CD56<sup>Dim</sup> en co-cultivos en presencia de MO-MSCs, DS-MSCs y DP-MSCs.
- Determinar la capacidad citotóxica de células NK co-cultivadas en presencia de MO-MSCs, DS-MSCs y DP-MSCs.

## **VII. Método**

### **1. Obtención de células estromales mesenquimales**

Para el proyecto se usaron MSCs de dermis de individuos sanos (DS-MSCs), dermis de la zona lesionada de la piel de pacientes con psoriasis (DP-MSCs) y MO de individuos sanos (MO-MSCs). Todas las MSCs provenientes de las fuentes a evaluar ya se tenían crio-preservadas. Previo a su crio-preservación, las MSCs fueron caracterizadas mediante determinación de su inmunofenotipo y capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, tal como nuestro grupo de investigación ha publicado previamente (Castro-Manrreza et al, 2019). Brevemente, para determinar el inmunofenotipo, se analizó la expresión de moléculas de superficie mediante citometría de flujo, fueron positivas a CD105, CD90, CD73, HLA-I y CD13; y negativas a HLA-DR, CD45, CD14, CD34 y CD31. Para determinar su capacidad de diferenciación, se cultivaron en presencia de medio osteogénico (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá), Condrogénico (Cambrex Bio Sciences Walkersville, Inc, Maryland USA) o adipogénico (Stem Cell Technologies) durante tres semanas. Después de ese periodo se comprobó la diferenciación mediante la evaluación de la actividad de la fosfatasa alcalina (osteogénesis), o las tinciones de rojo oleoso (adipogénesis) y azul alciano (condrogénesis).

Las MO-MSCs se obtuvieron de muestras de 5ml de MO, previo

consentimiento informado, de donadores adultos hematológicamente sanos, en el Hospital de traumatología y ortopedia del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Estas se separaron de células mononucleares mediante gradiente de densidad.

La piel sana fue obtenida a partir de individuos sometidos a cirugías gastrointestinales practicadas en el hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS).

Las biopsias de piel de pacientes con psoriasis fueron obtenidas de pacientes que acudieron al servicio dermatológico de hospital “Adolfo López Mateos”, perteneciente al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores de Estado (ISSSTE). Las biopsias fueron tomadas con sacabocados de 5mm de diámetro, en la región de lesión. Los pacientes estuvieron 15 días antes de la toma de muestra sin tratamiento. Las biopsias de piel se procesaron mediante disgregación enzimática con dispasa II 1mg/ml (Proteasa grado II, Roche) y mecánica. Se colocaron en placas de cultivo con medio RPMI 1640 (Biowest) suplementado.

## **2. Obtención de células NK**

Los linfocitos NK se aislaron de sangre periférica de individuos sanos. Por gradiente de densidad (Lymphoprep, Stem Cell Technologies) se separaron de la sangre

periférica, las células mononucleares. A continuación, se utilizaron perlas CD56<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) para separar por selección positiva a las células con este fenotipo. Se evaluó el porcentaje de células CD56<sup>+</sup> obtenidas mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD56-PECy7 (BioLegend, San Diego, California, USA), siendo más del 85% positivas.

### **3. Co-cultivos y ensayos biológicos**

#### **3.1 Ensayo de proliferación**

Para los ensayos de proliferación, se descongelaron las MSCs de cada fuente y se cultivaron con medio DMEM-bajo en glucosa (Lg-Biowest, Nuailé, Francia) al 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest), 10 µl/ml de penicilina-estreptomina, 10µl/ml de gentamicina y 10µl/ml de L-glutamina. Una vez alcanzada una confluencia del 80-90%, las células se cosecharon con tripsina-EDTA. Se sembraron 20,000 MSCs de las diferentes fuentes por pozo, en placas de 96 pozos de fondo plano, con DMEM-Ig al 10% de SFB, suplementado con penicilina, estreptomina, gentamicina y L-glutamina. Se dejaron 24hrs para que formaran una monocapa, pasadas la 24hrs se retiró el medio y se adicionó medio de co-cultivo, el cual consistió en 50% DMEM-Ig, 50% RPMI 1640 (Biowest) al 10% de SFB suplementado con penicilina, estreptomina y L-glutamina. Después se colocaron 100,000 células CD56<sup>+</sup> por pozo, recién obtenidas y teñidas con carboxifluoresceina éster Succimidil (CFSE) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) a una concentración de 2µM. Las células

CD56<sup>+</sup> se estimularon con 15ng/ml de IL-2 (R&D, Minneapolis, USA) y se dejaron en co-cultivo 5 días. Como controles se sembraron al mismo tiempo, células CD56<sup>+</sup> teñidas con CFSE (Invitrogen) sin MSCs y estimuladas con IL-2 (R&D) (control positivo) y sin estimular (control negativo). Se realizaron co-cultivos MSCs/Células CD56<sup>+</sup> en presencia y ausencia de contacto celular. Para esta última condición se utilizó una membrana permeable con un ancho de poro de 0.4µm (Transwells, Corning, New York, USA).

Después de 5 días, se cosechó la fracción no adherente y se realizó una tinción para citometría de los marcadores CD56-PECy7 (BioLegend), CD3-PE (BD) y para viabilidad 7AAD (BD). Se realizó la lectura de los marcadores en el citómetro FACS CANTO II BD (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) el mismo día. Con ayuda del programa FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, Oregón USA) se analizaron las poblaciones: NK (CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>), NK<sup>Bright</sup> (CD56<sup>Bright</sup> CD3<sup>-</sup>), NK<sup>Dim</sup> (CD56<sup>Dim</sup> CD3<sup>-</sup>) por separado.

### **3.2 Ensayo de citotoxicidad**

Para evaluar citotoxicidad se sembraron 40,000 MSCs por pozo en placa de 48 pozos. Se dejaron durante 24hrs con DMEM-Ig al 10% de SFB, suplementado con penicilina, estreptomina, gentamicina y L-glutamina (en las concentraciones antes descritas) para obtener una monocapa. Posteriormente se retiró el medio y se adicionó medio de co-cultivo (50%DMEMIg, 50%RPMI al 10% de SFB suplementado con penicilina, estreptomina y L-glutamina). Se adicionaron

350,000 células CD56<sup>+</sup> por pozo, recién obtenidas y estimuladas con 15ng/ml de IL-2. Al 5 día de co-cultivo se tomaron las células no adherentes (efectoras) y se colocaron en placas de 96 pozos con fondo en U en conjunto con la línea celular K-562 (células blanco), en medio RPMI 1640 al %10 de SFB, suplementado con penicilina, estreptomycin y L-glutamina. Se sembraron en proporciones 1:1 (50,000:50,000), 2:1(100,000:50,000) y 4:1(200,000:50,000) Efector:Blanco, durante 4hr.

A las células obtenidas de los co-cultivos se les realizó una tinción para citometría con CD56-PECy7, AnnexinV-APC (BD) y 7AAD. Se realizó la lectura el mismo día en el citómetro FACS CANTO II BD y el análisis de datos se llevó a cabo con el programa FlowJo. El porcentaje de citotoxicidad se evaluó sumando el porcentaje de células en apoptosis temprana (Annexin V<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>-</sup>), más el porcentaje de las células en apoptosis tardía (Annexin V<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>+</sup>)

#### **4. Análisis estadístico**

La n de las muestras de MSCs fue de 5 para cada tipo y cada una se co-cultivó con dos donadores de diferentes células CD56<sup>+</sup>. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS statistics 25, mediante ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tukey tomando como nivel de significancia los valores mayores a 0.05.

## **VIII. Resultados**

### **1. Las DS-MSCs y DP-MSCs disminuyen la proliferación de células NK en contacto celular**

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado la presencia de MSCs en la dermis tanto de donadores sanos como de pacientes con psoriasis y se determinó que las MSCs provenientes de ambos donadores no tienen la capacidad de reducir la proliferación de linfocitos T activados (Cortés-Morales, Tesis de Maestría, 2018), lo cual en el caso de la psoriasis puede favorecer la inflamación crónica que se observa en estos pacientes. Se sabe que, en el ambiente inflamatorio de la dermis en las zonas afectadas de los pacientes con psoriasis, no solo se encuentran incrementados los linfocitos T, sino también otros elementos celulares inmunes como las células NK (Dunphy y Gardiner, 2011; Lowes et al, 2014; Chiricozzi et al, 2018) y a la fecha no sabemos el efecto que puedan tener las MSCs presentes en la dermis sobre dichas células NK. Se ha reportado que las MSCs de MO son capaces de disminuir la proliferación de células NK estimuladas (Sotiropoulou et al, 2006; Spaggiari et al, 2006) y el mismo efecto se ha publicado con DS-MSCs proveniente de prepucio (Najar M. et. al. 2017). Con estos antecedentes en este estudio decidimos evaluar la capacidad de las DP-MSCs de inhibir la proliferación de las células NK con inmunofenotipo CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>.

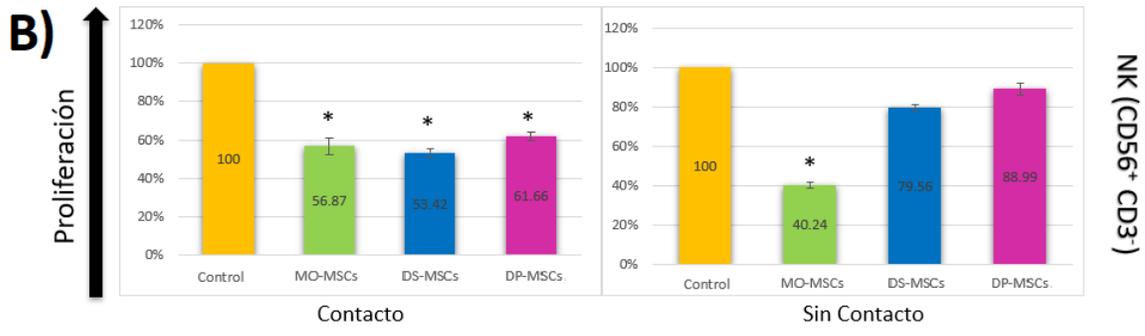
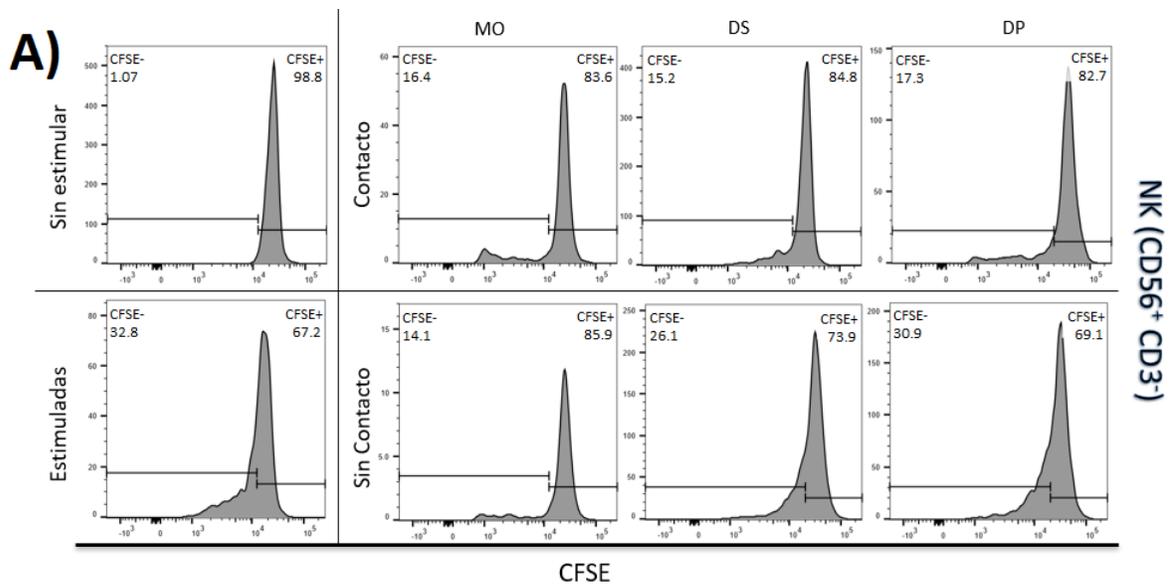
Para determinar lo anterior se obtuvieron poblaciones de células NK (CD56<sup>+</sup>) a partir de sangre periférica mediante selección positiva.

Una vez enriquecida la población de células NK, fueron teñidas con CFSE y sembradas en co-cultivos por cinco días con MSCs provenientes de MO, DS y DP con y sin contacto celular y en presencia de IL-2. Como control se utilizaron células CD56<sup>+</sup> tenidas con CFSE y cultivadas bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de MSCs. Se analizó la proliferación de la de células NK CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> mediante citometría de flujo. La proliferación de células NK estimuladas en ausencia de MSCs se usaron como control y se consideró como el 100% de proliferación.

Observamos que en la condición de co-cultivo en presencia de contacto celular (MSCs/células NK), las MSCs de MO, DS y DP disminuyeron de manera significativa la proliferación de las células NK (56.87%±4, 53.42%±2 y 61.66%±2 respectivamente) con respecto al control (100%) (Figura 6).

En ausencia de contacto celular se observó que solo en los co-cultivos con presencia de MO-MSCs se disminuyó significativamente la proliferación de células NK (40.24%±2) con respecto al control (100%), a diferencia de aquellos con MSCs de DS y DP (79.56%±2 y 88.99%±3 respectivamente) (Figura 6).

Estos resultados nos indican una capacidad disminuida de las MSCs para inhibir la proliferación de células NK, tanto de aquellas provenientes de la dermis de donadores sanos como de los pacientes con psoriasis, con respecto a las de médula ósea.



**Figura 6. Proliferación de células NK en presencia de MSCs provenientes de MO, DS y DP.**

A) Histogramas representativos de la proliferación de células NK en contacto celular (arriba) y sin contacto celular (abajo). B) Media normalizada de porcentaje de proliferación de células NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> activadas con IL-2 en presencia de MSCs de MO, DS y DP; como control se usaron células NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> activadas con IL-2 en ausencia de MSCs, su porcentaje de proliferación se tomó como el 100%. Las células NK redujeron su proliferación significativamente en contacto celular con MSCs de MO, DS y DP, mientras en ausencia de contacto celular la disminución de su proliferación solo fue significante en presencia de MSCs de MO. \*P≤0.05

## 2. Las DS-MSCs y DP-MSCs disminuyen la proliferación de la subpoblación NK<sup>Dim</sup>.

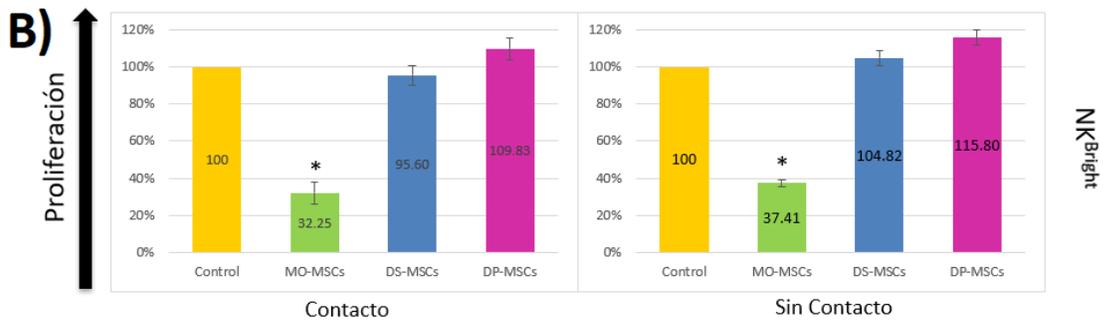
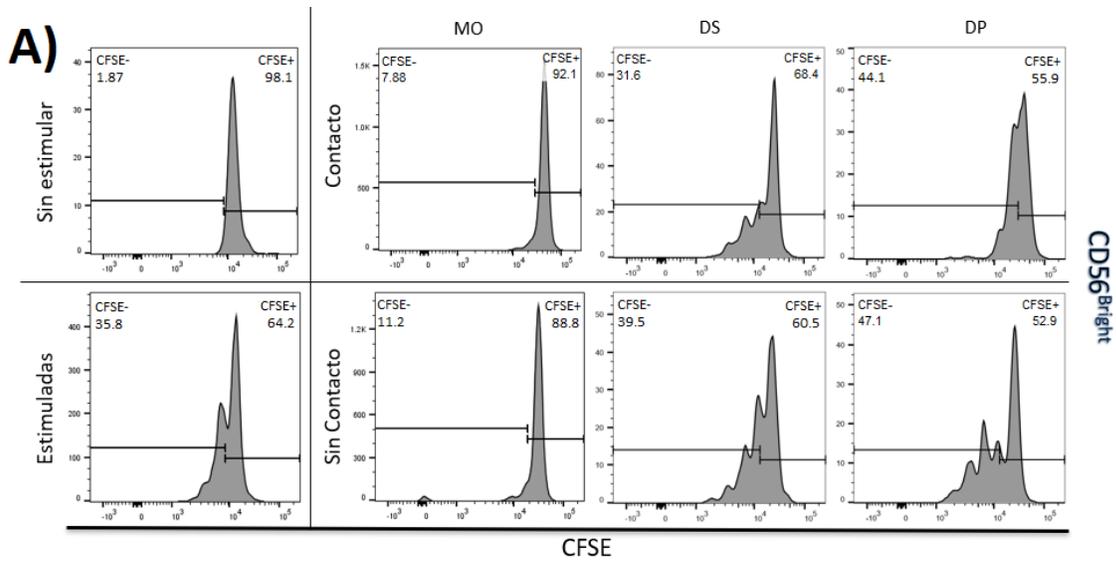
Hay dos subpoblaciones de células NK, las CD56<sup>Dim</sup> y las CD56<sup>Bright</sup>, las células CD56<sup>Dim</sup>, son altamente citotóxicas, estas se encuentran en estadio maduro; las células CD56<sup>Bright</sup> producen citocinas proinflamatorias, cuentan con pocas funciones citotóxicas y tienen un fenotipo inmaduro (Mendoza-Rincón, 2004; Suen et al, 2018 y Toubin y Vadasz, 2019). Las células NK presentes en infiltrado celular de la dermis en lesiones psoriásicas en su mayoría son de la población CD56<sup>Bright</sup> y liberan altas cantidades de INF- $\gamma$ , ayudando así a activar las funciones inflamatorias de lo KCs (Ottaviani et. al. 2005).

Por este motivo, se evaluó la proliferación de las subpoblaciones de linfocitos NK: Bright y Dim. Para lo cual, células CD56<sup>+</sup>, fueron teñidas con CFSE y sembradas en co-cultivos por cinco días con MSCs de MO, DS y DP; con y sin contacto celular, se activaron con IL-2. Como control se utilizaron células CD56<sup>+</sup> tenidas con CFSE y cultivadas bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de MSCs. Con el programa FlowJo se analizaron dos poblaciones CD56<sup>Bright</sup> (células NK<sup>Bright</sup>) y CD56<sup>Dim</sup> (células NK<sup>Dim</sup>). La proliferación de linfocitos NK estimulados con IL-2 en ausencia de MSCs (control) se consideró como el 100% de proliferación.

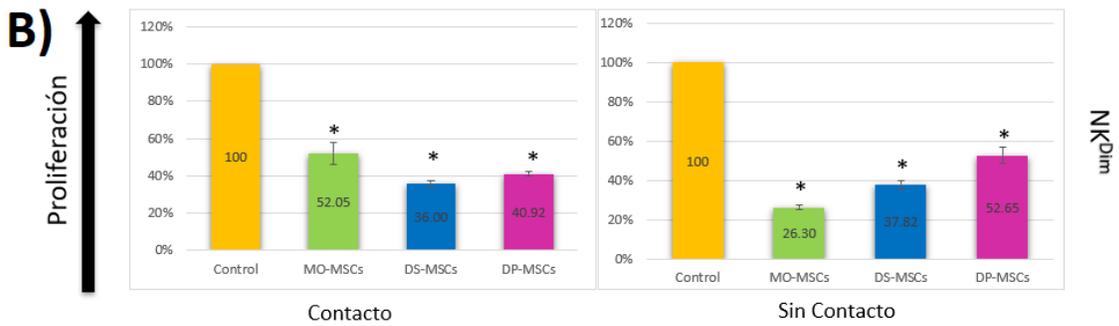
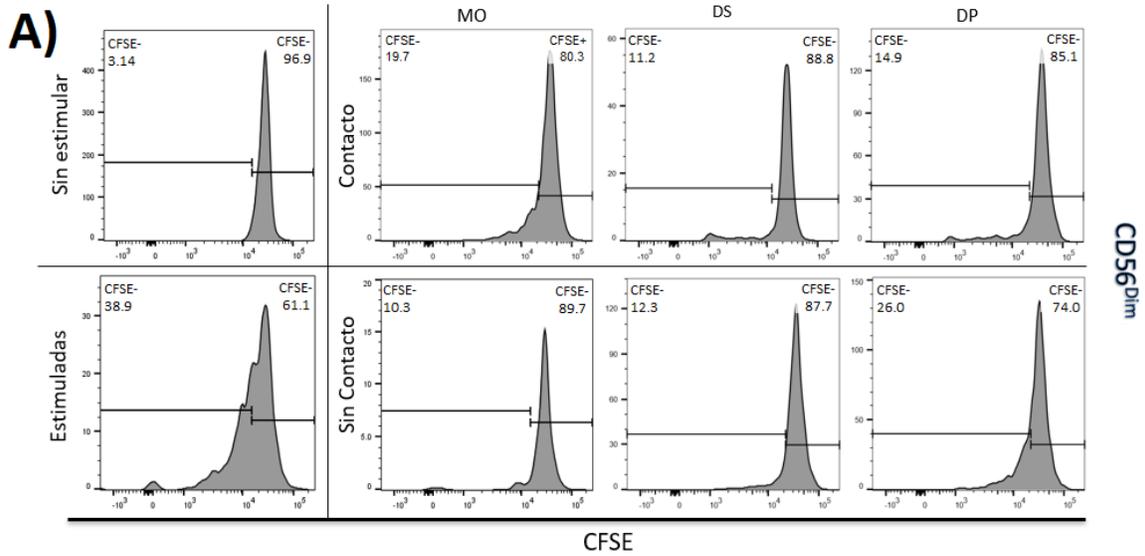
Se observó que las NK<sup>Bright</sup> en cultivo con MO-MSC disminuyen significativamente su población (32.25% $\pm$ 6 en contacto celular, 37.41% $\pm$ 3 sin contacto celular). En cambio, DS-MSCs no redujo la proliferación de la subpoblación de NK<sup>Bright</sup>

(95.60%±5 en contacto celular, 104.82%±4 sin contacto celular). De igual manera, observamos un comportamiento similar en la proliferación de NK<sup>Bright</sup> en los cocultivos en presencia de DP-MSCs (109.83%±6 en contacto celular y 115.80%±4 sin contacto celular) (figura 7).

Mientras, la proliferación de las NK<sup>Dim</sup> fue inhibida en presencia de los tres estromas. Al estar en contacto celular con MO-MSCs (52.05%±6), DS-MSCs (36.00%±2) y DP-MSCs (40.92%±1); y sin contacto celular en presencia de MO-MSCs (26.30%±1), DS-MSCs (37.82%±2) y DP-MSCs (52.65%±4) (figura 8).



**Figura 7. Proliferación de células NK<sup>Bright</sup> de MSCs provenientes de MO, DS y DP.** A) Histogramas representativos de la proliferación de células NK<sup>Bright</sup> en contacto celular (arriba) y sin contacto celular (abajo). B) Media normalizada de porcentaje de proliferación de células NK<sup>Bright</sup> (CD56<sup>Bright</sup> CD3<sup>-</sup>) activadas con IL-2 en presencia de MSCs de MO, DS y DP; como control se usaron células CD56<sup>+</sup> activadas con IL-2 en ausencia de MSCs, su porcentaje de proliferación se tomó como el 100%. Las células NK<sup>Bright</sup> solo disminuyeron su proliferación en presencia de MO-MSC. \*P<0.05



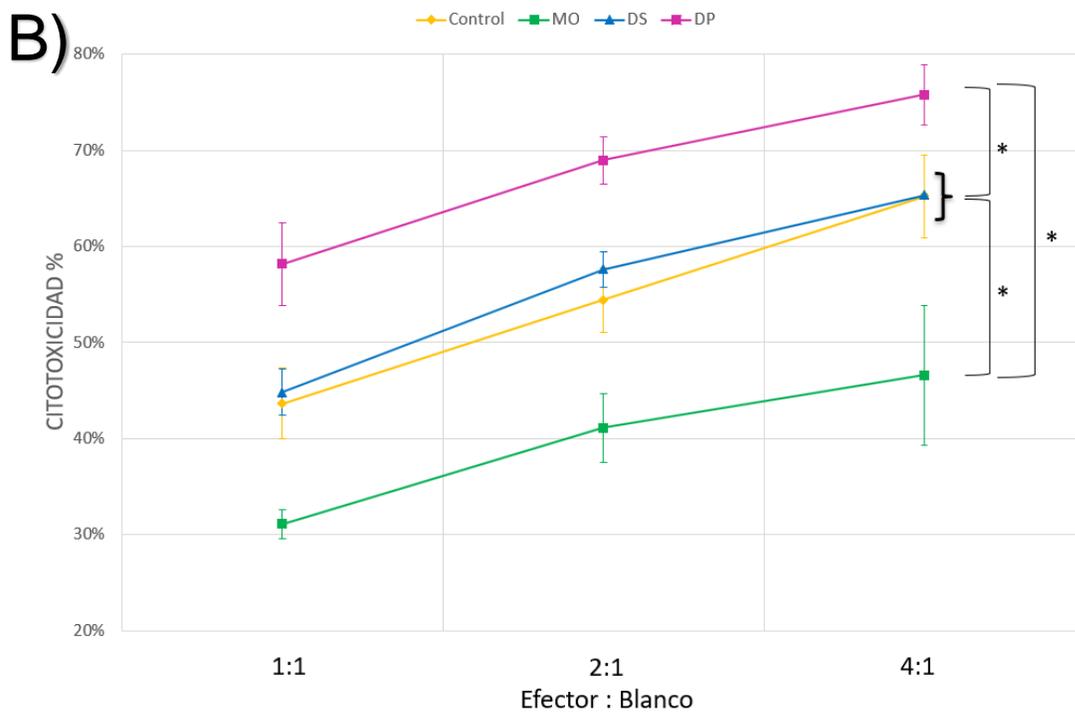
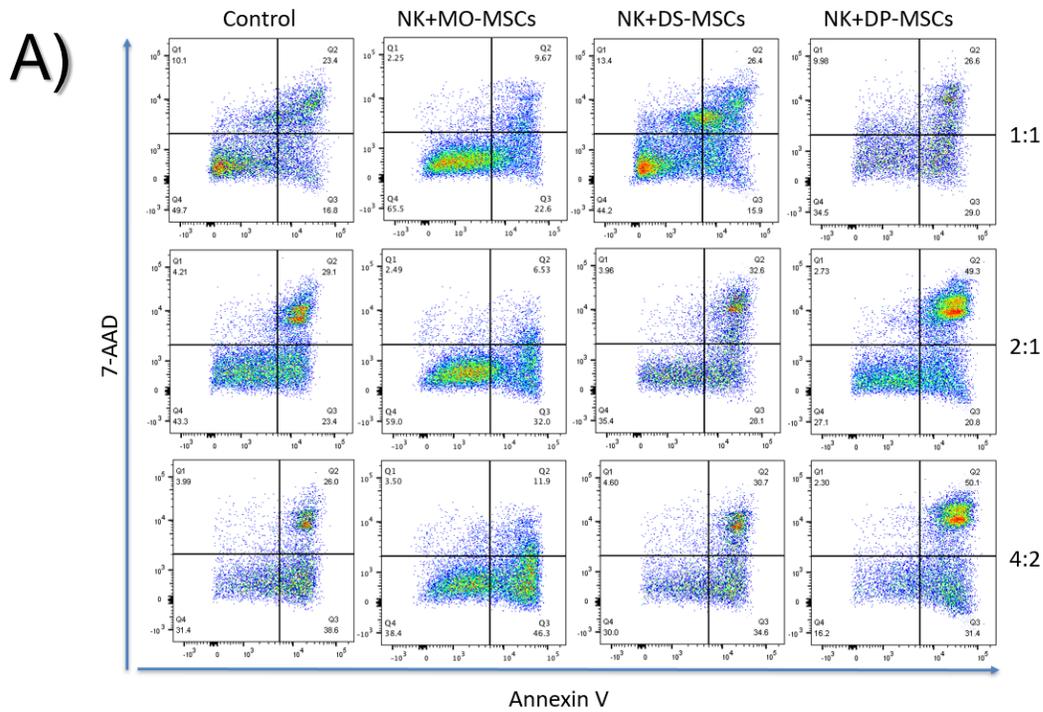
**Figura 8. Proliferación de células  $NK^{Dim}$  de MSCs provenientes de MO, DS y DP.** A) Histogramas representativos de la proliferación de células  $NK^{Dim}$  en contacto celular (arriba) y sin contacto celular (abajo). B) Media normalizada de porcentaje de proliferación de células  $NK^{Dim}$  ( $CD56^{Dim} CD3^+$ ) activadas con IL-2 en presencia de MSCs de MO, DS y DP; como control se usaron células  $CD56^+$  activadas con IL-2 en ausencia de MSCs, su porcentaje de proliferación se tomó como el 100%. Las células  $NK^{Dim}$  disminuyen su proliferación significativamente en todos los casos. \* $P \leq 0.05$

### **3. Las DP-MSCs aumenta la actividad citotóxica de NK**

Una función importante de las células NK es su capacidad citotóxica, la cual en el contexto de una respuesta inflamatoria crónica como la que se presenta en las zonas de lesión de la piel de los pacientes con psoriasis, puede ser un componente que favorece dicha respuesta. Se ha publicado que las MSCs de MO disminuyen la actividad citotóxica de las células NK (Sotiropoulou et al, 2006; Spaggiari et al, 2008), sin embargo, a la fecha no se conoce si las MSCs provenientes de la piel de las zonas lesionadas de pacientes con psoriasis tienen dicha capacidad al igual que las provenientes de MO. Debido a lo anterior decidimos evaluar el efecto de MSCs de DS y DP sobre esta actividad funcional en las células NK.

Para ello, se cultivaron células CD56<sup>+</sup> estimuladas con IL-2 en presencia de MSCs de MO, DS y DP durante cinco días en contacto celular. Se decidió evaluar dicho aspecto bajo esta condición de co-cultivo, debido a que fue en donde previamente observamos efecto sobre la proliferación celular, en presencia de MSCs provenientes de la dermis. Posterior a los 5 días de co-cultivo, se cosecharon y retaron frente células de la línea celular K562 como blanco a diferentes proporciones celulares 1:1, 2:1 y 4:1, (Efector:Blanco) durante 4 horas. Después las células K562 se tiñeron con 7-AAD y Annexin V y se calculó el porcentaje de citotoxicidad con la suma de la apoptosis temprana (AnnexinV<sup>+</sup> 7.AAD<sup>-</sup>), más la apoptosis tardía (AnnexinnV<sup>+</sup> 7-ADD<sup>+</sup>) de las células diana. Como control positivo fueron utilizadas células CD56<sup>+</sup> estimuladas con IL-2 y cultivadas bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de MSCs.

Como se esperaba las células NK en co-cultivo con MO-MSCs disminuyeron su actividad citotóxica de forma significativa ( $31.11\% \pm 2$ ,  $41.13\% \pm 4$  y  $46.60\% \pm 7$  respectivamente a las proporciones 1:1, 2:1 y 4.1). Las NK que estuvieron en contacto DS-MSCs ( $44.80\% \pm 2$ ,  $57.64\% \pm 2$  y  $65.35\% \pm 0.1$  respectivas porciones 1:1, 2:1 y 4.1) se comportó de forma muy similar al control ( $43.65\% \pm 4$ ,  $54.42\% \pm 3$  y  $65.22\% \pm 4$  respectivas porciones 1:1, 2:1 y 4.1). Mientras las NK provenientes de co-cultivo con DP-MSCs aumentaron su actividad citotóxica ( $58.16\% \pm 4$ ,  $68.98\% \pm 2$ ,  $75.80\% \pm 3$  respectivas porciones 1:1, 2:1 y 4.1) (figura 9).



**Figura 9. DP-MSCs aumentan la citotoxicidad de las células NK.** A) Gráficas de puntos representativas de la apoptosis de células de la línea K562 después de estar en co-cultivo con células NK de los diferentes estromas celulares bajo diferentes proporciones E:B (1:1, 2:1, 4:1). B) Gráfica de porcentajes de citotoxicidad. La citotoxicidad de células NK provenientes de DP-MSCs fue significativamente mayor a las NK-control y a la provenientes de DS-MSCs. En tanto las NK que estuvieron con MO-MSCs fueron significativamente menos citotóxicas que a las NK-control y a la provenientes de DS-MSCs. \*Indica diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ).

## IX. Discusión

En el 2014, los estados miembros de la organización mundial de la salud (OMS) declararon a la psoriasis como “serious non-communicable disease” (enfermedad no contagiosa de importancia), por ser una de las enfermedades crónicas más comunes, que afecta a personas de todas las edades sin distinción de género (Michalek et al, 2016). La psoriasis es considerada una enfermedad autoinmune que causa una inflamación constante en la piel y crecimiento de KCs aberrantes. Esta inflamación esta mediada por alteraciones del sistema inmune innato y adaptativo (Alwan y Nestle, 2015).

Se ha sugerido que las MSC de la piel de pacientes con psoriasis presentan un comportamiento alterado y aberrante que induce el inicio y mantenimiento de la lesión, en el cual sus propiedades inmunosupresoras y de reparación de tejidos no están ejerciendo efecto (Campanati et al, 2014).

Las MSCs se identificaron originalmente en la medula ósea (Friedentein et al, 1974), desde entonces la MO es la fuente de MSC más estudiada. Actualmente se conoce que esta población celular se puede obtener de diferentes tejidos ya sea neonatales o adultos, estas fuentes cuentan con diferentes potenciales de diferenciación (Montesinos et al, 2009) e inmunoregulación (Castro-Manrreza et al, 2014). Por ello es necesario evaluar las propiedades de cada fuente.

Recientemente nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia de MSCs en dermis y epidermis, tanto de individuos sanos como en pacientes con psoriasis, se ha determinado su perfil inmunofenotípico y su capacidad de

diferenciación (Castro-Manreza et al, 2019). Estas muestran potenciales de diferenciación e inmunoregulación diferentes a los conocidos en MO. Nuestro grupo evaluó la capacidad inmunoreguladora de MSCs de piel psoriásica sobre linfocitos T, encontrando que estas MSCs no disminuyen su proliferación (Cortés-Morales, Tesis de Maestría, 2018). Sin embargo, no hay estudios que analicen el comportamiento de células NK o algún otro componente de la inmunidad innata, en presencia de MSCs derivadas de esta patología. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió a las MSCs de dermis sana y dermis de lesiones psoriásicas, para determinar si afectan las actividades funcionales de células NK.

Anteriormente se ha reportado la capacidad de las MSCs de MO de disminuir la proliferación de las células NK (Sotiropoulou et al, 2006; Spaggiari et al, 2006) y recientemente se probaron los mismos efectos con MSCs de dermis de prepucio (Najar et al, 2017). Tomando en cuenta estos antecedentes, en este estudio evaluamos de manera comparativa la capacidad inmunosupresora de las MSCs provenientes de DS y DP con aquellas de MO.

Nuestros resultados evidenciaron que efectivamente las MO-MSCs tienen capacidad de disminuir la proliferación de las células NK. También nuestros resultados demostraron que las MSCs provenientes de DS y DP disminuyeron la proliferación de células NK estimulados con IL-2 al estar en contacto celular. Estos resultados no se observaron en ausencia de contacto célula-célula.

Posiblemente debido a mecanismos de protección de la piel, observamos que la DS-MSCs sin contacto celular no afecta significativamente la proliferación de células NK. Ya que la piel es la primera línea de defensa de un organismo contra patógenos, por lo tanto, necesita la constante presencia de células inmunes para

proteger al organismo. En contacto celular las MSCs son susceptibles a ser lisadas por células NK (Spaggiari et al, 2006; Najjar et al, 2018), esto también se ha observado anteriormente con MSCs de DS (Najar et al 2017), esto estimula en los linfocitos NK la producción de INF- $\gamma$ , el cual se conoce induce la actividad inmunosupresora MSCs provocando una mayor secreción de moléculas inmunosupresoras como IDO y PGE2 que inhiben la proliferación de las células NK (Spaggiari et al, 2008; Krampera et al, 2009; Prigione et al, 2009). Siendo así, al estar en contacto célula-célula, las MSC de DS y DP activan los mecanismos inmunosupresores que permiten la disminución de la proliferación de las células NK.

Ottaviani et al, reportaron que la mayoría de las células NK presentes en el infiltrado celular de las lesiones psoriásicas son de la subpoblación CD56<sup>Bright</sup> (Ottaviani et al, 2005). Dado estos antecedentes, revisamos la proliferación por separado de los subconjuntos CD56<sup>Bright</sup> y CD56<sup>Dim</sup>. Encontrando en nuestros resultados que las células NK<sup>Bright</sup> en co-cultivo con MSCs de DS y DP (con y sin contacto) no disminuyeron su proliferación. Es conocido que las CD56<sup>Bright</sup> representa una población de NK inmadura altamente liberadora de citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , estas citocinas son particularmente importantes en el proceso inflamatorio de la psoriasis por su función inflamatoria, además se encuentran en mayor proporción en lesiones psoriásicas que en piel psoriásica donde no hay lesión y en piel sana (Suen et al, 2018 y Toubin y Vadasz, 2019), se reportó que las células NK de lesiones psoriásicas liberan altas cantidades de INF- $\gamma$ , ayudando así a activar las funciones inflamatorias de los queratinocitos y otras células inmunes (Ottaviani et al, 2005). Adicional a lo anterior, el INF- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , son consideradas entre las citocinas iniciadoras de la psoriasis (Alwan y Nestla, 2015) (figura 10).

Por otro lado, en nuestros resultados encontramos que la subpoblación CD56<sup>Dim</sup> disminuye su proliferación al estar en presencia de MSCs de DS y DP. En un estudio parecido con MSCs derivadas de carcinoma de pulmón de células escamosas, se demostró que las MSCs favorecían el incremento de la subpoblación CD56<sup>Dim</sup>, no obstante, esta subpoblación no presentó una mayor capacidad citotóxica, ya que también las MSCs inducían en esta subpoblación una menor expresión de los receptores activadores NKp30, NKp44, NKG2D y DNAM-1 y del marcador de desgranulación CD107a, lo cual ayuda a la progresión del tumor (Galland et al, 2017). Basados en este estudio no podemos concluir que la disminución de proliferación en la subpoblación de CD56<sup>Dim</sup> por parte de DS- y DP-MSCs, ayude a disminuir la funcionalidad de esta subpoblación. Se necesitan más estudios para un mejor entendimiento de las interacciones de DP-MSCs/NKs y su participación en la inflamación presente en la psoriasis (figura 10).

Es importante señalar que en todos los experimentos de proliferación de células NK en presencia DP-MSCs, se observó una tendencia de valores mayores a los obtenidos con aquellas de DS-MSCs (con y sin contacto); esto incluye la proliferación de las subpoblaciones CD56<sup>Dim</sup> y CD56<sup>Bright</sup>, lo cual sugiere que las DP-MSCs tienen un potencial inmunosupresor reducido, respecto a las MSC de DS.

Otra actividad efectora de las células NK que evaluamos es la citotoxicidad. Hay reportes que indican que las MSCs de MO son capaces de inhibir esta actividad, ya que disminuyen la expresión de receptores de activación como NKP30, NKp44 y NKG2D en NK (Sotiropoulou et al, 2006; Spaggiari et al, 2008). En nuestros experimentos de apoptosis, efectivamente la citotoxicidad de las células NK que estuvieron en co-cultivo con MSCs de MO fue reducida de forma

significante; DS no tuvo ningún efecto sobre la citotoxicidad de NK, mientras que las provenientes de DP fueron significativamente más citotóxicas. Esto sugiere que posiblemente las MSCs en las lesiones psoriásicas podrían estar favoreciendo el aumento de la inflamación y la lisis de queratinocitos (figura 10).

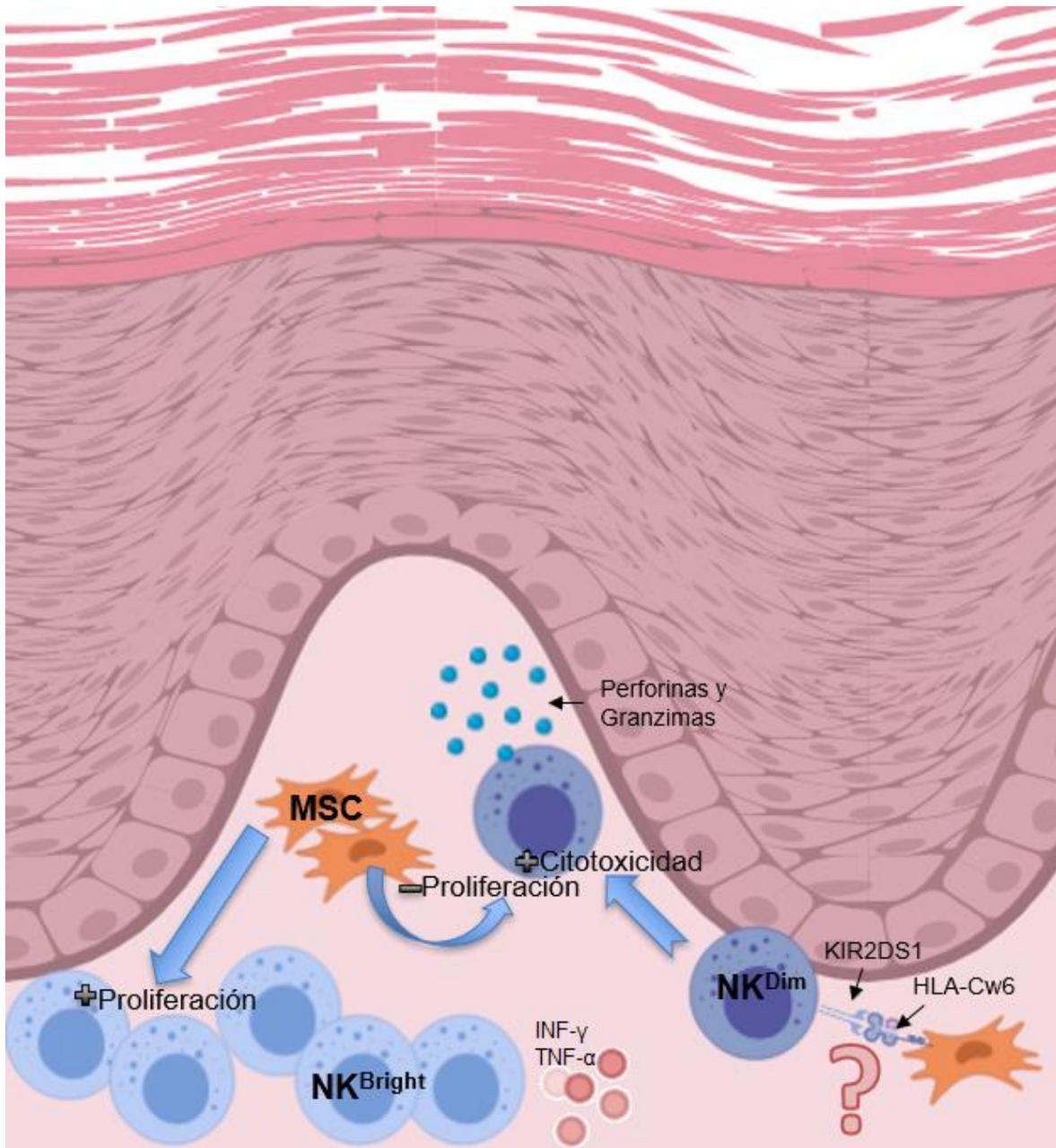
Estudios anteriores en nuestro grupo de trabajo reportaron un aumento en la expresión de HLA-I en las MSCs de dermis de pacientes con psoriasis (Castro-Manrreza et al, 2019). Las alteraciones genéticas en HLA-I han sido ampliamente reportados en pacientes con psoriasis. Particularmente HLA-C es interesante desde la perspectiva de las células NK, ya que todos los alelos HLA-C codifican ligandos para KIR expresados por las células NK. Principalmente HLA-Cw6 ha sido señalada como una variante de riesgo para la psoriasis, esta región también conocida como PSORS1, es el vínculo genético más relacionado con la psoriasis de inicio temprano, confiriendo más del 50% de susceptibilidad a la psoriasis (Alwan y Nestle, 2015; Chen y Tsai, 2018; Harden et al 2015; Dunphy y Gardiner, 2011).

El receptor activador KIR2DS1 y su contraparte KIR2DL1, los cuales se unen fuertemente a HLA-Cw6, no siempre están presentes en la superficie de la misma célula NK ya que los receptores KIR se expresan estocásticamente (Chaper et al, 2017; Cagnet et al, 2010). Se ha descrito que los genes del receptor activador de células NK KIR2DS1, se encuentran sobreexpresados en los pacientes con psoriasis Vulgaris y su alteración genética da mayor susceptibilidad a la psoriasis y a desarrollar artritis psoriásica (Luszczek et al, 2004; Martin et al, 2002; Suzuki et al, 2004).

Además, hay otros tres genes de la región HLA-I relacionados a la psoriasis, que tienen roles bien definidos en la biología de las células NK: HLA-B, HLA-E y

MIC-A. Los genes HLA-B que codifican para un epítipo Bw4 proporcionan ligandos para un receptor activador KIR3DS1 y su contra parte KIR3DL1. HLA-E es una molécula de clase I no clásica que proporciona un ligando para los receptores NKG2A y NKG2C expresados por las células NK, y MIC-A codifica un antígeno expresado en respuesta al estrés o situaciones patológicas particulares que activan las células NK a través de la ligadura de NKG2D. MIC-A ha sido relacionado a un mayor riesgo de psoriasis vulgar. Las células NK interactúan con los KCs a través de toda esta gama de receptores y ligandos (Harden et al 2015; Dunphy y Gardiner, 2011).

Dados nuestros resultados podría pensarse, que la expresión alterada de HLA-I este provocando una constante activación en células NK, ya que es conocido que las células NK se activan a los cambios de expresión de HLA-I en las células diana (Mendoza-Rincón, 2004; O'Connor et al, 2006; Torres-García et al, 2008), esto podría explicar la alta citotoxicidad de las NK al estar en contacto con DP-MSCs (figura 10). Por otro lado, también se ha observado que las NK pueden estimular la expresión de HLA-I, dado que en un estudio previo se observó que los sobrenadantes de estas células estimuladas por IL-2 indujeron la activación de los KCs causando la regulación positiva de las moléculas de HLA-I (Ottaviani et al, 2005). Si esto mismo sucede en las MSCs, las células NK estarían manteniendo la expresión de niveles altos de HLA-I, lo cual favorecería a mantener el ambiente inflamatorio en la psoriasis.



**Figura 10. Interacción de DP-MSCs con NK.** Las MSCs inhiben la proliferación de NK<sup>Dim</sup>, mientras que no afectan la proliferación de NK<sup>Bright</sup>. Las MSCs aumentan la citotoxicidad de células NK, este proceso se puede presentar por la alta expresión de HLA-I en MSC.

## X. Conclusiones

La capacidad inmunosupresora de las MSCs de DS y DP solo se observa de manera significativa en contacto directo con la población total de células NK CD56<sup>+</sup>.

Las MSCs de DS y DP no son capaces de disminuir la proliferación de la subpoblación de células NK CD56<sup>Bright</sup>, tanto en ausencia como en presencia de contacto celular.

Las MSCs de DS y DP tienen la capacidad de disminuir la proliferación de la subpoblación CD56<sup>Dim</sup>, tanto en ausencia como en presencia de contacto celular.

Las MSCs de DP tienen el potencial de aumentar de manera significativa la capacidad citotóxica de las células NK, contrario a las MO-MSCs que la disminuyen significativamente. Aquellas MSCs provenientes de DS, no mostraron efecto alguno sobre la capacidad citotóxica de las células NK.

Las MSCs provenientes de DP poseen un bajo potencial inmunosupresor, en comparación con aquellas de MO y DS, para disminuir la proliferación y capacidad citotóxica de las células NK, incluso esta última función biológica se ve incrementada en presencia de las DP-MSCs, lo cual puede favorecer la inflamación crónica en la piel de los pacientes con psoriasis.

## **XI. Perspectivas**

Se ha comprobado que las MSCs pueden producir citocinas proinflamatorias; sería interesante evaluar si DP-MSCs produce citocinas activadoras de células NK tales como IL-2, IL-12, IL-15, IL-18. También sería importante determinar el efecto de DP-MSCs sobre la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  de células NK.

Las NK<sup>Bright</sup> presentan poca citotoxicidad, en cambio NK<sup>Dim</sup> se conocen por ser altamente citotóxicas. En nuestros experimentos DP-MSCs solo disminuyó la proliferación de NK<sup>Dim</sup>. En contraste, en los experimentos de citotoxicidad las NK aumentaron su potencial citotóxico al estar en contacto con DP-MSCs. Por tal motivo, resultaría de gran interés comparar la citotoxicidad de las subpoblaciones NK<sup>Dim</sup> y NK<sup>Bright</sup> por separado y comprobar si las NK<sup>Dim</sup>, pese a su poca presencia en la zona lesionada de psoriasis presenta una alta capacidad citotóxica o bien si las NK<sup>Bright</sup> en psoriasis, también cumplen funciones citotóxicas dentro de la lesión psoriásica.

Para determinar el efecto de las DP-MSCs sobre la actividad citotóxica de las células NK, se utilizó a una línea celular que se ha reportado como blanco de éstas (K562), pero sería muy interesante evaluar el efecto de las DP-MSCs sobre la citotoxicidad de las células NK hacia queratinocitos para con ello establecer un modelo más cercano a una condición fisiológica, dado que los KCs son las principales células diana en las zonas de lesión.

También sería relevante evaluar si la DP-MSCs modifican la expresión de receptores activadores en células NK.

Para comprobar que PGE2 e IDO son las moléculas responsables de la actividad inmunosupresora de las DP-MSCs sobre las células NK, se debe evaluar el efecto de inhibidores de estas moléculas en este sistema de co-cultivo.

Nuestros resultados demostraron que las DP-MSC si influyen sobre las células NK para aumentar la inflamación en la piel de personas con psoriasis, resultaría de gran interés revisar las propiedades inmunoregulatoras de DP-MSCs hacia otras células inmunológicas como las células dendríticas, macrófagos o células NKT.

## XII. Referencias

Alwan W y Nestle FO (2015). Pathogenesis and Treatment of Psoriasis: Exploiting Pathophysiological Pathways for Precision Medicine. *Clinical Experimental Rheumatology*, 33(93): S2-6

Boehncke W-H y Schön MP (2015). Psoriasis. *The Lancet*, 386(9997):983–994. doi:10.1016/s0140-6736(14)61909-7

Boyman O, Conrad C, Tonel G, Gillie M y Nestle FO (2007). The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends in Immunology*, 28(2):51–57. doi:10.1016/j.it.2006.12.005

Campanati A, Orciani M, Consales V, Lazzarini R, Ganzatti G, Di Benedetto G, Di Primio R y Offidani A (2014). Characterization and profiling of immunomodulatory genes in resident mesenchymal stem cells reflect the Th1-Th17/Th12 imbalance of psoriasis. *Archives of Dermatological Research*, 306 (10):915–920. doi 10.1007

Castro-Manrreza ME, Bonifaz L, Castro-Escamilla O, Monroy-García A, Cortes-Morales A, Hernández-Estévez E, Hernández-Cristino J, Mayani H y Montesinos JJ (2019). Mesenchymal Stromal Cells from the Epidermis and Dermis of Psoriasis Patients: Morphology, Immunophenotype, Differentiation Patterns and Regulation of T Cells Proliferation. *Stem Cells International*, 1-13 ID 4541797.

Castro-Manrreza ME, Mayani H, Monroy-García A, Flores-Figueroa E, Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet V, Santiago-Osorio E y Montesinos JJ (2014). Human Mesenchymal Stromal Cells from adult and Neonatal Sources: A Comparative In Vitro Analysis of Their Immunosuppressive Properties Against T Cell. *Stem cells and Development*, 23(11). doi:10.1089/scd.2013.0363

Castro-Manrreza M y Montesinos JJ (2015). “Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications”. *Journal Of Immunology*

*Research*, 1-20. doi: 10.1155/2015/394917

Chapel A, Garcia-Beltran W, Hölzemer A, Ziegler M, Lunemann S, Martus G y Altfeld M (2017). Peptide-specific engagement of the activation NK cell receptor KIR2DS1. *Sci Rep* 7, 2414. doi: 10.1038 / s41598-017-02449-x

Chen L y Tsai TF (2018) HLA-Cw6 and psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 178(4):854–862. doi:10.1111/bjd.16083

Chiricozzi A, Romanelli P, Volpe E, Borsellino G, y Romanelli, M (2018). Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(179):1-31. doi:10.3390/ijms19010179

Cognet C, Farnarier C, Gauthier L, Frassati C, André P, Magérus-Chatinet A, Anfossi N, Rieux-Laucat F, Vivier E y Schleinitz N. (2010). Expression of the HLA-C2-specific activating killer-cell Ig-like receptor KIR2DS1 on NK and T cells. *Clinical Immunology*, 135(1):26–32. doi:10.1016/j.clim.2009.12.009

Cortés-Morales VA (2018). Evaluación de la capacidad de inmunoregulación sobre linfocitos T de células Estromales Mesenquimales provenientes de la piel de pacientes con psoriasis. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Di Meglio P, Perera GK y Nestle FO (2011). The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. *Immunity*, 35(6):857-869 doi:10.1016/j.immuni.2011.12.003

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F y Krause D (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315-317. doi: 10.1080/14653240600855905

Dunphy S y Gardener CM (2011). NK cell and Psoriasis. *Journal of biomedicine and Biotechnology*, 1-10. doi:10.1155/2011/248317

Ebert LM, Meuter S y Moser B (2006). Homing and Function of Human Skin T Cells and NK Cells: Relevance for Tumor Surveillance. *The Journal of Immunology*, 176(7):4331–4336. doi:10.4049/jimmunol.176.7.4331

Estrada-Aguilar I, Amaya-Guerra M, Gomez-Flores M, Guevara-Sangines E, Jurado-Santacruz F, Lopez-tello-Santillan A, Maldonado-Garcia C, Rivera -Gomez M, Rodriguez-Martinez, Vega-Gonzalez L (2015). Metas mexicanas en el tratamiento de la psoriasis. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro social*. 55(1):90-97

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF y Keiliss-Borok IV (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17(4):331-40 doi:10.1097/00007890-197404000-00001

Galland S, Vuille J, Martin P, Letovanec I, Caignard A, Fregni G y Stamenkovic I (2017). Tumor-Derived Mesenchymal Stem Cells Use Distinct Mechanisms to Block the Activity of Natural Killer Cell Subsets. *Cell Reports*, 20(12):2891–2905. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.089

Harden JL, Krueger JG y Bowcock AM (2015). The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 64:66-73. doi:10.1016/j.jaut.2015.07.008

Hou R, Li J, Niu X, Liu R, Chang W, Zhao X, Wang Q, Li X, Yin G, y Zhang K (2016). Stem cells in psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 86(3):181-186. doi:10.1016/j.jdermsci.2016.11.006

International Federation of Psoriasis Associations. World Psoriasis Day 2015. Disponible en: <https://ifpa-pso.com/our-actions/world-psoriasis-day>

Krampera M, Lorenzo C, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani Sy Annunziato F (2009). Role for Interferon- $\gamma$  in the Immunomodulatory Activity of

Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Translation and clinical research* 24(2):386–398. doi:10.1634/stemcells.2005-0008

Lowes MA, Suarez-Fariñas M y Krueger JG (2014). Immunology of Psoriasis. *Annual Review of Immunology*, 32:227–255. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120225

Łuszczek W, Mańczak M, Cisło M, Nockowski P, Wiśniewski A, Jasek M, y Kuśnierczyk P (2004). Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Human Immunology*, 65(7):758–766. doi:10.1016/j.humimm.2004.05.008

Mak RK, Hundhausen C y Nestle FO (2009). Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis. *Actas Dermosifiliogr.* 100(2):2-13

Martin MP, Nelson G, Lee J-H, Pellett F, Gao X, Wade J, Wilson MJ, Trowsdale J, Gladman D y Carrington M (2002). Cutting Edge: Susceptibility to Psoriatic Arthritis: Influence of Activating Killer Ig-Like Receptor Genes in the Absence of Specific HLA-C Alleles. *The Journal of Immunology*, 169(6):2818–2822. doi:10.4049/jimmunol.169.6.2818

Mendoza-Rincon JF (2004). Células NK: nuevos roles en su función inmunológica. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud.* 7(1-2):44-53

Michalek IM, Loring B y John SM (2016). A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31(2):205–212. doi:10.1111/jdv.13854

Montesinos JJ, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, Flores-Guzmán P, Hernández-Estévez E, Fajardo-Orduña G, Orozco S y Mayani H (2009). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative análisis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expresión. *Cytotherapy* 11(2):163-176. doi:10.1080/14653240802582075

Najar M, Fayyad-Kazan M, Meuleman N, Bron D, Fayyad-Kazan H y Lagneaux L (2017). Immunomodulatory effects of foreskin mesenchymal stromal cells (FSK-MSCs) on natural killer (NK) cells. *Journal of Cellular Physiology*, 233(7):5243-5254. doi:10.1002/jcp.26305

Najar M, Fayyad-Kazan M, Meuleman N, Bron D, Fayyad-Kazan H, y Lagneaux, L. (2018). Mesenchymal stromal cells of the bone marrow and natural killer cells: cell interactions and cross modulation. *Journal of Cell Communication and Signaling*. doi:10.1007/s12079-018-0448-4

Nestle FO, Di Meglio P, Qui JZ y Nickoloff BJ (2009a) "Skin Immune Sentinels in health and disease". *Nature Reviews Immunology*, 9(10):679–691. doi:10.1038/nri2622

Nestle FO, Kaplan DH, y Barker J (2009b). Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 361(5):496–509. doi:10.1056/nejmra0804595

O'Connor GM, Hart OM y Gardiner CM (2006). Putting the natural killer cell in its place. *Immunology*, 117(1):1–10. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02256.x

Orciani M, Campanati A, Salvolini E, Lucarini G, Di Benedetto G y Offidani A, (2011). The mesenchymal stem cell profile in psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 165(3):585-592. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10438.x

Ottaviani C, Nasorri F, Bedini C, Pitta O, Girolomoni G y Cavani A (2006). CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *European Journal of immunology*, 36(1):118–128. doi:10.1002/eji.200535243

Pasparakis M, Haase I y Nestle FO (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Reviews Immunology*, 14(5):289-301. doi:10.1038/nri3646

Poggi A, Prevosto C, Massaro AM, Negrini S, Urbani S, Pierri I, Saccardi R, Gobbi M y Zocchi MR (2005). Interaction between human NK cells and bone marrow

stromal cells induces NK cell triggering: role of NKp30 and NKG2D receptors. *Journal of Immunology* 175:6352–6360.

Sotiropoulou P, Perez S, Gritzapis A, Baxevanis C y Papamichail M (2006). Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *Stem Cells*, 24(1):74-85. doi: 10.1634/stemcells.2004-0359

Spaggiari G, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari M, y Moretta L (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111(3):1327-1333. doi: 10.1182/blood-2007-02-074997

Spaggiari G, Capobianco A, Becchetti S, Mingari M, y Moretta L (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107(4):1484-1490. doi: 10.1182/blood-2005-07-2775

Spaggiari G y Moretta L (2012). Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity. *Immunology and Cell Biology*, 91(1):27–31. doi:10.1038/icb.2012.62

Suen WC, Lee MY, Leung KT, Pan XH, Li G (2018). Natural killer cell-Based Cancer Immunotherapy: A Review on 10 Years Completed Clinical Trials. *Cancer investigation*, 36(8):431-457. doi:10.1080/07357907.2018.1515315

Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y, Ishikawa K, Yoshikawa Y, Sasazuki T, y Muto M. (2004). Genetic Polymorphisms of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors Are Associated with Susceptibility to Psoriasis Vulgaris. *Journal Of Investigative Dermatology*, 122(5):1133-1136 doi:10.1111/j.0022-202x.2004.22517.x

Torres-García D, Barquera R, Zúñiga J (2008). Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Vallegas*. 21(1):57-

Toubi E y Vadasz Z (2019). Innate immune-responses and their role in driving autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 18(39):306-311  
doi:10.1016/j.autrev.2018.10.005

Visscher M y Narendran V (2014). The ontogeny of skin. *Advances in Wound Care*, 3(4):219-303

Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L y Vivier E (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: l'union fait la force. *Blood*, 10(6): 2252-2258.

## **Apéndice A: Reactivos.**

### **Obtención de células NK:**

- Sangre periférica.
- Solución salina.
- Lymphoprep, (Stem Cell Technologies)
- Perlas CD56 + (Miltenyi Biotec)

### **Cultivos:**

- Solución salina
- DMEM-Lg (Biowest)
- RPMI 1640 (Biowest)
- Suero fetal bovino (SFB) (Biowest),
- Penicilina
- Estreptomina
- Gentamicina
- L-glutamina.
- Tripsina-EDTA.
- IL-2 (R&D)

### **Anticuerpos:**

- CD56-PECy7 (BioLegend)
- CD3-PE (BD)

### **Otros marcadores:**

- Carboxifluoresceína éster Succimidil (CFSE) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)
- 7AAD (BD).
- AnnexinV-APC (BD)