



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN
PROGRAMA EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR**

**Participación de componentes de la matriz extracelular en la
respuesta inflamatoria de células mononucleares**

TESIS DE MAESTRÍA

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA

Q.F.B. JAVIER ARTURO SÁNCHEZ LÓPEZ

Directores de tesis

Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano
Unidad Médica de Investigación en Inmunoquímica
Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI

Dra. María Isabel Baeza Ramírez
Laboratorio de Biomembranas
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN

México, D.F. a 17 de Diciembre del 2009



Índice:

	Páginas
Indice de figuras y tablas.....	i
Abreviaturas.....	ii
Resumen	iii
Abstract	v
Agradecimientos	vii
I. Introducción.....	1
I.1 Psoriasis.....	1
I.2 Placas psoriásicas. Persistencia del proceso inflamatorio.....	3
I.3 Citocinas y placas psoriásicas.....	3
I.4 Participación de los leucocitos en la actividad inflamatoria	5
I.5 Infiltración de los leucocitos a la piel.....	5
I.6 Interacción sistema inmune - matriz extracelular.....	8
I.7 Matriz extracelular y psoriasis.....	10
I.8 Justificación.....	11
I.9 Hipótesis.....	12
I.10 Objetivos	12
Objetivo general	
Objetivo particular	
II. Metodología.....	12
II.1 Grupos de estudio	13
II.2 Criterio de selección de sujetos.....	13
Criterios de inclusión	
Criterios de no inclusión	
Criterios de exclusión	
Carta de consentimiento informado.....	14
II.3 Toma de muestra de sangre periférica.....	15
II.4 Obtención de células mononucleares de sangre periférica por la técnica de gradiente de ficoll.....	15
II.5 Verificación de la viabilidad celular.....	15

II.6 Recubrimiento de placas con colágena tipo I y tipo IV.....	16
II.7 Estimulación de CMSP con colágenas	16
II.7.1 Estimulación para los ensayos de expresión de TLRs.....	16
II.7.2 Estimulación para los ensayos de activación de NF-κB.....	17
II.7.3 Estimulación para los ensayos de con el inhibidor de actividad de MMPs	17
II.8 Determinación de la expresión de TLR4 por citometría de flujo	18
II.9 Identificación de NF-κB activo	18
II.9.1 Separación de núcleos para identificación de NF-κB	18
II.9.2 Identificación de NF-κB translocado a núcleo por citometría de flujo....	19
V.9.3 Identificación de NF-κB activo en células.....	19
II.10 Preparación de zimogramas para detección de MMPs.....	20
II.11 Preparación de muestras para los microarreglos de expresión	20
III. Resultados.....	21
III.1 Expresión de TLRs en las células CD14+ de sujetos sanos y sujetos psoriásicos.....	21
III.2 Expresión de TLR 4 en las células CD14+ de sujetos sanos y sujetos psoriásicos tratadas con el inhibidor de actividad de metaloproteinasas	24
III.3 Actividad de metaloproteinasas producidas por CMSP de sujetos con psoriasis y sanos expuestos a colágena tipo I y tipo IV por zimografía.....	25
III.4 Detección de NF-κB activo en núcleos de CMSP estimuladas con LPS por citometría de flujo	26
III.5 Detección de NF-κB en núcleos de CMSP incubadas en colágena por citometría de flujo.....	27
III.6 Detección de NF-kB activo en CMSP incubadas en colágena, por citometría de flujo.....	28
III.7 Análisis de la expresión diferencial de genes en CMSP de sujetos psoriásicos estimulados con colágena tipo IV y LPS por microarreglos de expresión	28

IV. Discusión	31
V. Conclusiones	38
VI. Referencias	39

Índice de Figuras y tablas

		Página
Figura 1	<i>Diferencias entre los estratos dérmicos de piel sana y piel psoriásica.....</i>	2
Figura 2	<i>Principales componentes de la matriz extracelular en la piel</i>	7
Figura 3	<i>Esquema de separación de CMSPs por la técnica de Ficoll.....</i>	12
Figura 4	<i>Selección de poblaciones de células mononucleares de sangre periférica para el análisis de la expresión de TLRs.....</i>	21
Figura 5	<i>Expresión de TLR 2 en las células CD14 de sujetos sanos y sujetos psoriásicos</i>	22
Figura 6	<i>Expresión de TLR 4 en las células CD14 de sujetos sanos y sujetos psoriásicos.....</i>	23
Figura 7	<i>Expresión de TLR 4 en células CD14+ de sujetos sanos y psoriásicos en presencia del inhibidor de MMPs GM6001.....</i>	24
Figura 8	<i>Zimograma de actividad de metaloproteinasas (MMP) con actividad colagenolítica.....</i>	25
Figura 9	<i>Cinética de activación de las subunidades p50 y p65 de NF-kB en núcleos de CMSP de sujetos sanos y psoriásicos con LPS</i>	26
Figura 10	<i>Cinética de activación de las subunidades p50 y p65 de NF-kB en núcleos de CMSP de sujetos sanos y psoriásicos con o sin colágena tipo IV.....</i>	27
Figura 11	<i>Porcentaje de NF-kB fosfo p65 de monocitos (CD14+) de sujetos sanos y sujetos psoriásicos.....</i>	28
Figura 12	<i>Genes pro-inflamatorios y anti-inflamatorios expresados diferencialmente en CMSP de sujetos psoriásicos</i>	30
Tabla 1	<i>Tipos de Psoriasis.....</i>	1
Tabla 2	<i>Células productoras de citocinas.....</i>	3

Lista de Abreviaturas

CAM	Moléculas de adherencia celular
CD	Cluster de diferenciación
CLA	Antígeno leucocitario cutáneo
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
Col I	Colágena tipo I
Col IV	Colágena tipo IV
CPA	Células presentadoras de antígeno
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
Cy5	Cianina 5
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FITC	Isocianato de fluoresceína
GAG	Glucosaminoglicano
HEV	Vénulas con endotelios altos
HLA	Complejo principal de histocompatibilidad también MHC
IL	Interleucina
IFN	Interferón
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocito T
LTc CD8+	Linfocito T citotóxico
LTh CD4+	Linfocito T cooperador
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasa de matriz
MyD88	Gen 88 primario de la respuesta de la diferenciación mieloide
NF- κ B	Factor nuclear- κ B
NK	Linfocito asesino natural
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PE	Ficoeritrina
PMSF	Fenilmetanosulfonil fluoruro
PRR	Receptores de reconocimiento de patrón
STAT	Señales de transducción activadoras de la transcripción
RGD	Secuencia de aminoácidos arginina, glicina y ácido aspártico
TCR	Receptor del linfocito T
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
UI	Unidades Internacionales
VCAM	Molécula vascular de adherencia celular

RESUMEN

La presencia del fenómeno inflamatorio en los tejidos requiere de la activación de células residentes, así como de la infiltración de monocitos, linfocitos y/o neutrófilos al tejido afectado. Estas últimas células al migrar a través del tejido que infiltran, reconocen mediante receptores específicos a los diferentes componentes de la matriz extracelular (MEC) y activan la expresión de moléculas como las metaloproteinasas (MMPs) que al degradar las proteínas de la MEC facilitan esta migración. Adicionalmente, es factible que las MMPs activas generen péptidos que puedan activar a las células inflamatorias al actuar como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los monocitos reconocen a los DAMPs a través de receptores de la respuesta inmune innata, como son los receptores tipo Toll (TLRs), que al reconocer su ligando, activan el factor nuclear (NF)- κ B que incrementa la expresión de genes proinflamatorios. La psoriasis es una enfermedad inflamatoria de evolución crónica con manifestaciones cutáneas, que en 70% de los casos corresponde a las llamadas placas psoriásicas. Estas lesiones consisten en engrosamiento de la epidermis con hiperproliferación de queratinocitos invariablemente asociada con la infiltración de células de estirpe inmunológica y acumulación de citocinas proinflamatorias, como TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral), IL-8 (Interleucina 8) e IL-1 β . Estas citocinas pueden funcionar como factores de crecimiento para los queratinocitos y favorecer la formación de la lesión. En trabajos previos comprobamos que el contacto de células mononucleares de sangre periférica (CMSP, que potencialmente pueden infiltrar piel) con colágena IV (principal componente de membrana basal de vasos sanguíneos y epidermis) aumenta la secreción de IL-1 β y posteriormente activadas con lipopolisacárido (LPS, principal ligando descrito para TLR 4), sí las células provienen de sujetos con psoriasis y no de sujetos sanos. Concordantemente, la secreción de IL-10 (citocina anti-inflamatoria) inducida por la colágena tipo IV, es significativamente menor en las CMSP de pacientes con psoriasis. Así, en el presente trabajo, decidimos explorar si esta mayor respuesta inflamatoria inducida por el reconocimiento de las colágenas IV y I (principal componente de la dermis) involucra mayor expresión y señalización de TLR4, relacionadas con la secreción de MMP-9 activas, así como exploramos la expresión diferencial de genes relacionados a la respuesta inflamatoria al exponer CMSP de sujetos sanos y psoriásicos a colágena. Observamos que al contacto con las colágenas IV y I, la

expresión de TLR 4 aumenta en monocitos psoriásicos a diferencia de las CMSP de sujetos sanos que disminuyen la expresión del receptor. De igual manera, se observó una mayor activación de NF- κ B en células de sujetos psoriásicos tanto en condiciones basales como después de la exposición a LPS. De manera muy interesante, la exposición a colágena tipo IV durante 30 min disminuye esta activación. Al realizar zimogramas al sobrenadante de CMSP expuestas a colágena, encontramos mayor actividad de MMP-9 en el caso de psoriasis. Y al inhibir parcialmente la actividad de estas MMPs, disminuye el efecto de sobreexpresión de TLR 4 en los monocitos de sujetos psoriásicos. Finalmente, encontramos que el contacto con colágena IV induce la sobreexpresión de genes proinflamatorios como el receptor de IL-1, varios receptores de TNF- α , algunos genes de quimiocinas, receptores de inmunidad innata como TLR 6 y el receptor de formilpéptidos (FPR)2 y las MMP-1 Y 7, así como disminuye la expresión de genes anti-inflamatorios como SIGIR (Inhibidor de la señalización de TLRs y receptor de IL-1) y el gen para la IL-10. Nuestras evidencias sugieren que mientras que en el caso de las CMSP de sujetos sanos, el reconocimiento de colágena parece disminuir la capacidad inflamatoria de las células, en los sujetos psoriásicos este reconocimiento promueve su capacidad proinflamatoria; fenómeno que es parcialmente dependiente de la actividad de MMP-9.

ABSTRACT

The sustainment of the inflammatory process in the tissues requires the activation of resident cells and the infiltration of monocytes, lymphocytes and neutrophils to the affected tissue. When these cells migrate through the tissue, they sense with specific receptors, the different components of the extracellular matrix (ECM) and activate the secretion of some enzymes like the matrix metalloproteinases (MMPs), which can fragment the ECM proteins facilitating migration. It is feasible that the activated MMPs generate peptides that can activate the inflammatory cells by acting as damage associated molecular patterns (DAMPs). The monocytes can recognize these DAMPs through innate immune receptors as the Toll like receptors (TLRs). When they recognize its ligands they start a signalling process that activates the nuclear factor (NF)- κ B which increases the expression of proinflammatory genes. Psoriasis is a chronic inflammatory disease, clinically expressed in the skin, manifested in the 70% of all cases by psoriatic plaques. These lesions are characterized by an engrossment of the epidermis derived by a hyperproliferation of keratinocytes associated with a persistent infiltrate of immune system cells and an accumulation of proinflammatory cytokines as TNF- α (Tumor necrosis factor), IL-8 (Interleukin 8) and IL-1 β . These cytokines act as growth factor for the keratinocyte hyperproliferation and in this way allowing and supporting the plaque formation. In a previous work, we verified that peripheral blood mononuclear cells (PBMC, which can potentially infiltrate the skin) exposed to collagen type IV (main constituent of the basement membrane of blood vessels and epidermis) increases the IL-1 β secretion, even more when they are later activated with lipopolysaccharide (LPS, the main ligand described for TLR 4) mainly when cells come from the psoriatic patient. According with this observation, the secretion of IL-10 (an anti-inflammatory cytokine) induced by collagen, is considerably lower in the psoriatic patient cells. Because of these arguments we decided to verify if this increased inflammatory response can be induced by the contact and recognition of types IV and I (principal component of dermis ECM) collagens by PBMC of psoriatic patients, which can enhance the expression and signalling of TLR 4, in correspondence with the active MMP-9 (collagenase) secretion, and the differential expression profile of inflammation related genes. We found that the exposure with type IV and I collagens increases the TLR 4 expression in psoriatic

monocytes, in contrast with its reduction of expression in healthy ones. Correspondingly we found that there is an increased activation of NF- κ B in psoriatic cells even in non-stimulated conditions, as in the exposure to LPS. Interestingly the 30 min exposure to collagen type IV diminish its activation. When we verified the activity of MMPs in supernatant of stimulated PBMC by zimograms, we found an increased activity of MMP-9 in psoriatic cells. The inhibition of the MMPs catalytic activity lead to a decrease in the overexpression of TLR 4 in psoriatic monocytes. Finally, we found that the contact of PBMC with collagen type IV enhances the expression of a lot of proinflammatory genes as the IL-1 receptor, TNF receptors, some innate immunity receptors as TLR 6 and the formylpeptide receptor (FPR)2, increase of MMP-1 and MMP-7 and the release of chemokines. It also inhibits the expression of some anti-inflammatory genes as SIGIR (molecule that blocks the activation of TLR and IL-1R reponse) and the IL-10 gen. Our evidences suggest that while in healthy cells the recognition of collagen can decrease the inflammatory potential of the cells, in psoriatic cells it enhances their proinflammatory potential which may be dependent of the MMP-9 activity.

Dedicatoria y agradecimientos:

A mi familia Mónica, Arturo, Pedro, Gabriel, Daniel, Andrea, Anaís y Ángel. Porque su cariño me ha hecho grande, seguro y me da la fuerza para seguir.

En especial para mis hermanitas y mis hermanitos, recuerden que no importa el título, sino que hagan lo que hagan lo gocen, lo vivan y mueran por ello. Piensen siempre, critiquen, cuestionen y sobre todo no se conformen.

All you need is love, just keep it in mind...

A toda mi familia por su apoyo incondicional.

A mis amigos por mantenerme cuerdo y a veces no tan cuerdo. Gracias Daría, Poncho, Rodrigo, Ani, Julián.

A la UIMIQ mis hermanos, por todo el apoyo y los momentos de estrés colectivo que vivimos a diario. Isma, Marce, Jackie, Alexis (testaruda jeje), Esteban, Daniel, Isa, Gaby, Dr. Ferat, Dr. Constantino, Cris, Christian, Pablo II, Marisol, Raúl, Pablo I, Mario, José Carlos, Leo, Pancho, Dr. Eduardo Rodríguez, Verito, Maira (creo que no falta nadie).

A Lulu, por todos los cocos y zapes bien merecidos, pero sobretodo por que siempre tienes las palabras exactas (de las que muchas veces carezco jeje).

Armando, creo que tendría que dedicarte toda una hoja, pero te agradeceré aquí de nueva cuenta por creer en mi.

Dra. Baeza, por sus consejos, su guía y sus regaños, sobre todo por su preocupación, su interés y todo el apoyo que me brindó.

Una mención muy especial al Dr. Eduardo Pérez Salazar, a Adriana y a Luisito del CINVESTAV, pues nos sacaron en muchas ocasiones de apuros y disfruté muy buenos momentos a su lado.

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades en el Centro Médico Nacional siglo XXI y en el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Con el apoyo de la beca de CONACyT para estudios de Maestría con número de registro 231996.

I. Introducción

I.1 Psoriasis.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria de evolución crónica que afecta del 2 al 6% de la población a nivel mundial. La principal manifestación clínica la constituye una dermatosis que puede consistir en lesiones de menos de 1 cm hasta abarcar más del 90% de superficie corporal(1). Adicionalmente, entre el 5 y el 42% de los casos se afectan también las uñas y/o las articulaciones, correspondiendo, en este último caso, a la artritis psoriásica, entidad que resulta altamente incapacitante(1, 2).

Desde el punto de vista de atención, esta enfermedad representa una de las 15 enfermedades más atendidas en la consulta dermatológica. Esta enfermedad, aunque no es mortal, compromete importantemente la calidad de vida de los pacientes, ya que al manifestarse en piel resulta estigmatizante(1, 3). Actualmente se desconoce la etiología de la enfermedad, aunque se ha asociado con más de 1,300 genes que pudieran estar contribuyendo a su desarrollo, entre los que se encuentran mutaciones en genes de la región de histocompatibilidad humana (HLA) como PSORS1 y PSORS2, genes que codifican la interleucina (IL)-12B y el receptor de la IL-23(4) o genes de diferenciación epidérmica como LCE3B/3C(3, 4).

Como se observa en la tabla I, el 70% de los casos de psoriasis, corresponden a la variedad de psoriasis vulgar o psoriasis en placa, que se caracteriza por la presencia de lesiones eritematosas con apariencia de escamas grisáceas. Al análisis histopatológico, estas lesiones, a diferencia de la piel normal (Figura 1) presentan un engrosamiento de la epidermis (hiperqueratosis), extensión anormal del estrato granular con formación de crestas (papilomatosis), pérdida en la diferenciación del estrato córneo de la epidermis (paraqueratosis) y un importante infiltrado de leucocitos en dermis y epidermis (Figura I.1)(1, 5-7).

Tabla 1. Tipos de Psoriasis(1).

Psoriasis vulgar	70 - 80%
Psoriasis gutata	10%
Psoriasis pustular	> 3%
Psoriasis eritrodérmica	> 3%

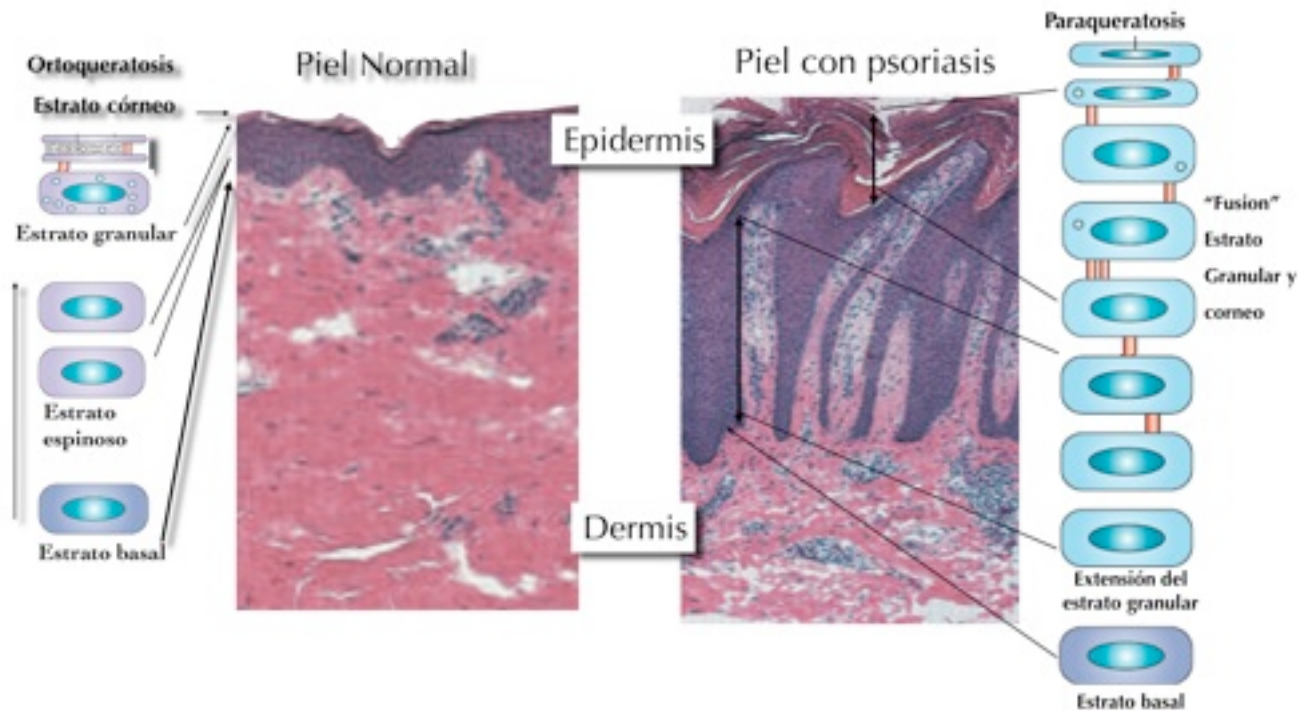


Figura 1. Diferencias entre los estratos dérmicos de piel sana y psoriásica. En los cortes histológicos de piel se observan las diferencias entre una piel sana (izquierda) y una piel psoriásica (derecha). En esta última claramente se observa el engrosamiento del estrato espinoso y granular, así como la falta de diferenciación y engrosamiento del estrato córneo. También es evidente el abundante infiltrado celular en la dermis⁴.

Aunque hasta el momento se desconoce la etiopatogenia de la psoriasis, está claro que las placas psoriásicas se forman cuando hay proliferación exacerbada de queratinocitos junto con un proceso inflamatorio local. La persistencia de este proceso inflamatorio, la elevada infiltración de células a la piel, la producción de mediadores pro-inflamatorios en la misma y la desregulación en la actividad celular queratinocítica dotan a la psoriasis de su carácter crónico(8).

I.2 Placas Psoriásicas. Persistencia del proceso inflamatorio.

Para que se generen las placas psoriásicas, es necesario contar con dos elementos: el primero son los queratinocitos psoriásicos, los cuales tienen como características inherentes una alta tasa de proliferación y resistencia a la apoptosis (y que explica la acumulación de células en las placas psoriásicas)(9); el segundo elemento, es la presencia de un proceso inflamatorio local(4, 6, 9).

La hipótesis más aceptada para explicar como interactúa el binomio Hiperproliferación-Inflamación propone que, el estímulo desencadenante, que puede corresponder a un antígeno en la epidermis(10), factores mecánicos, agentes químicos, infecciones bacterianas o estimulación neurogénica (estrés emocional)(6, 11, 12), activan a las células residentes de la piel (como queratinocitos y células del sistema inmune en la piel), que secretan mediadores quimioatrayentes (quimioquinas como Interleucina 8 (IL-8)) y pro-inflamatorios (citocinas como Interleucina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que favorecerán el infiltrado y activación de nuevas células leucocitarias en las lesiones. Estas citocinas (como son la interleucina 6 (IL-6) e IL-8) pueden servir como factores de crecimiento para los queratinocitos(6), con lo que se cierra el círculo vicioso de inflamación-proliferación de queratinocitos, asociado a las lesiones.

I.3 Citocinas y placas psoriásicas

La presencia de las citocinas en las placas psoriásicas está claramente relacionada con la permanencia de la lesión. Estas citocinas son producidas por diferentes tipos celulares concurrentes en la lesión (Tabla 2).

Tabla 2. Células productoras de citocinas en psoriasis(3, 6, 13)

Linfocitos	IL-2, IL-4, INF- γ , IL-17
Monocitos	IL-1 β , TNF- α , IL-6
Neutrófilos	IL-1 β , IL-8
Dendríticas	TNF- α , IL-12, IL-23, INF- α , IL-6, IL-18
Queratinocitos	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8

Ahora bien, así como su origen es diverso, estas citocinas pueden también actuar sobre diferentes estirpes celulares. Así, el factor de necrosis tumoral (TNF- α), puede inducir en los queratinocitos cambios en la expresión genética que modifican sus tasas de proliferación, diferenciación y migración celular, que involucrarán, tanto remodelación del citoesqueleto así como de la matriz extracelular (MEC); y también puede activar a las células infiltrantes inflamatorias mediante la señalización a través de su receptor (TNFR) que puede llevar al incremento de la transcripción de genes relacionados con el proceso inflamatorio; por ejemplo, a través de la activación del Factor Nuclear (NF)- κ B(14). La presencia de estas citocinas también favorece los procesos de angiogénesis, la síntesis de componentes de la MEC y quimiotaxis hacia piel de neutrófilos y células mononucleares de sangre periférica (monocitos y linfocitos). Todos estos procesos asociados a inflamación están exacerbados en la psoriasis. Así, la IL-8 y otras quimiocinas reclutan neutrófilos, monocitos, linfocitos T y pueden favorecer la activación de los macrófagos; la IL-5 junto con la IL-3 promueven la expansión y activación de mastocitos, mientras que el Interferón gamma (IFN- γ), el TNF- β también activan a los macrófagos que incrementan, entre otras, su actividad microbicida(4, 6, 15). A este proceso proinflamatorio exacerbado se puede sumar la disminución de citocinas como IL-10, IL-4 o factor de crecimiento transformante (TGF- β), citocinas caracterizadas como anti-inflamatorias, que al ser administrados subcutáneamente reducen los efectos inflamatorios(6).

Es entonces evidente que la actividad de las citocinas es primordial para el mantenimiento de las lesiones psoriásicas, no solo por su actividad sobre células del sistema inmune, sino también al actuar sobre los queratinocitos, ya que éstos son capaces de producir y secretar IL-1 β , IL-6 y TNF- α , de participar activamente en el reclutamiento de neutrófilos y linfocitos T mediante la secreción de IL-8(6). Es tal la importancia de las citocinas proinflamatorias en el mantenimiento de las placas, que cuando se utiliza como tratamiento un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de TNF- α (etanercept), hay una resolución del casi el 100% de las placas psoriásicas en el transcurso de seis meses(16).

I.4 Participación de los leucocitos en la actividad inflamatoria.

Como se mencionó previamente, la interacción de queratinocitos y leucocitos es de suma importancia para el proceso inflamatorio(7). Dentro de los cambios tempranos detectables que ocurren en la piel afectada por psoriasis, se encuentra el infiltrado de neutrófilos, a los que les siguen, como en cualquier proceso inflamatorio, y linfocitos T, células natural killer (NK), monocitos, macrófagos y células dendríticas. Este infiltrado precede a la hiperproliferación queratinocítica(6). Se presume que estas células infiltrantes son las mayores productoras de las citocinas pro-inflamatorias que mantienen el proceso inflamatorio, y se conoce también su participación, en donde los neutrófilos producirán IL-1 β , IL-8 y especies reactivas de oxígeno; los monocitos participan con la producción de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-18; las células dendríticas con IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-18 e IL-23, y los linfocitos T con IL-2, IFN- γ principalmente. Las células T se acumulan en la dermis papilar, a partir de la cual algunas células alcanzan a la epidermis. El infiltrado de linfocitos en la dermis está compuesto por células T cooperadoras CD4+, mientras que el infiltrado epidérmico consiste en células T citotóxicas(17). La acumulación de estas células, se debe a la presencia de moléculas de adhesión celular (CAM) en los linfocitos T (CLA antígeno cutáneo linfocitario e ICAM-1) y a la elevada expresión de sus factores de adhesión en las células del epitelio vascular (P y E- selectinas). La presencia de las CAM en los linfocitos T como CLA, se asocia principalmente a células de memoria en enfermedades inflamatorias de la piel(18). También se ha propuesto que los linfocitos T son autorreactivos, añadido a la facilidad con la que pueden penetrar a la piel por la presencia de moléculas de adhesión, generarán un proceso inflamatorio con mayor facilidad que facilitará también la interacción con las demás células pro-inflamatorias y los queratinocitos, favoreciendo así el círculo vicioso de estimulación para la perpetuación de las lesiones(19).

I.5 Infiltración de leucocitos y composición de la MEC en piel.

Una vez que el estímulo desencadenante en piel activa a las células residentes tanto queratinocitos como linfocitos T y células dendríticas, la producción de quimiocinas dará lugar a la activación del endotelio vascular. Esta activación favorecerá el reclutamiento de células circulantes hacia la piel. Cuando las células endoteliales expresan en su membrana

las P y E selectinas (que son receptores de glicoproteínas presentes en las membranas de los leucocitos) los leucocitos reconocen estos receptores, aumenta el número de glicoproteínas con gran afinidad por estas selectinas, como el ligando de P selectina tipo 1 (PSGL1), disminuyendo así el flujo de las células en los capilares, por el proceso de rodamiento en donde estos receptores se adhieren con baja afinidad a los ligandos en el endotelio. Durante el rodamiento, también se expresarán receptores de quimiocinas en membrana como el CCR7 que induce la activación de las integrinas, proteínas heterodiméricas que cuentan con una amplia capacidad de reconocimiento por componentes de la matriz extracelular (MEC) y algunas otras moléculas de adhesión en la superficie celular. Dependiendo de las subunidades que conforman a la integrina, será su capacidad de reconocimiento(20, 21); así, la $\alpha_4\beta_7$ y la $\alpha_4\beta_1$, reconocen a la molécula de adhesión intercelular (ICAM1) y a la molécula de adhesión vascular (VCAM1), respectivamente. Ambas expresadas en las células del endotelio vascular, por lo que se facilita la adhesión al endotelio y la activación de otras integrinas esenciales en el paso de las células a través del endotelio o diapédesis. Una vez que entran en contacto con el tejido, la migración celular depende, tanto de la expresión de moléculas de anclaje, como de aquellas que remodelan citoesqueleto y a la MEC (entre las que se encuentran las metaloproteinasas o MMPs); moléculas que pueden ser inducidas por el reconocimiento de los componentes de la MEC(22-24).

La MEC es una estructura macromolecular compuesta de una gran variedad de proteínas y polisacáridos que, por sus características estructurales, la dotan de flexibilidad y resistencia al estiramiento y compresión. Al asociarse estas moléculas, forman una red de soporte sobre la cual se encuentran adheridas las células que dan origen a los tejidos, brindándole fuerza a los órganos del cuerpo, que será variable dependiendo de las necesidades particulares del tejido debido a la composición que adquiera(25). Los proteoglicanos de la MEC, al hidratarse, forman una estructura base tipo gel, sobre la cual se embeben las proteínas fibrosas. Este gel dota a la MEC de resistencia a la compresión y permite la difusión rápida de los nutrientes, metabolitos y hormonas entre el torrente sanguíneo y las células tisulares(26). Las variaciones en las proporciones de los diferentes tipos de macromoléculas en la MEC y su organización, darán lugar a una gran diversidad de formas, que se adaptan a los requerimientos específicos de cada tejido como: en los huesos y dientes, en donde la MEC se calcifica para darles su rigidez característica; en la córnea, donde forma una estructura transparente; en los tendones, lugar donde forma

cordones que dan resistencia a la tensión; o en la interfase entre un epitelio y el tejido conectivo, en donde da origen a la lámina basal(26). Evidentemente, la composición de la matriz extracelular no es estática, ya que se remodela constantemente, lo que implica la ruptura de las estructuras proteínicas por proteasas específicas(27) durante diversos procesos completamente fisiológicos, como son la proliferación, reparación de daño tisular o migración celular en la organogénesis.



Figura 2. Principales componentes de la matriz extracelular en la piel normal²⁶⁻²⁸
 En la imagen se muestra la distribución de los componentes principales de matriz extracelular en dermis y en epidermis.

La MEC en la piel (Figura 2) se compone principalmente de colágena tipo I, colágena tipo IV, laminina, elastina, entactina, nidógeno y Perlecano. La colágena tipo I se localiza principalmente en huesos y tendones y constituye aproximadamente el 80% del total de las colágenas de la dermis humana adulta. La molécula de la colágena tipo I tiene la forma clásica de triple hélice y contiene 2 cadenas $\alpha 1(I)$ y una $\alpha 2(I)$, notoriamente diferente en la composición de sus aminoácidos. La colágena tipo I junto con la tipo III, forman extensas fibras extracelulares consideradas como las principales responsables de la resistencia a la tensión de la dermis(28). La colágena tipo IV forma las membranas basales

del organismo. En la piel forma la unión dermo-epidérmica (Figura 2), en donde forma una malla reticulada (a diferencia de las fibras características de los tipos I, II y III). Su composición es heterotrimérica $[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$, aunque podemos encontrarla en ocasiones como homopolímero $[\alpha 1(IV)]_3$ y $[\alpha 2(IV)]_3$. La molécula de colágena tipo IV se diferencia de otras colágenas por la presencia de interrupciones de tipo no colágena dentro del dominio triple helicoidal, lo que confiere flexibilidad a la molécula(28-30).

La distribución las colágenas es diferente entre dermis y epidermis. Mientras la colágena IV es más abundante en la membrana basal de la epidermis y vasos sanguíneos, la colágena tipo I es la forma más abundante en la dermis. Natural es entonces que los leucocitos infiltrantes de piel, una vez que han atravesado el endotelio vascular, entrarán en contacto con la colágena tipo IV de la membrana basal y a continuación con la colágena tipo I en la dermis. Este reconocimiento se llevará a cabo mediante las integrinas $\alpha 1\beta 1$ para la colágena tipos I y IV y la integrina $\alpha 2\beta 1$ para la colágena tipo I. El contacto con estas integrinas induce en la célula la expresión de más integrinas en membrana para la migración hacia el sitio de inflamación(31), además de inducir la liberación de MMP 9, e IL-1 β por la activación de NF- κ B(32). La liberación de estas MMPs es indispensable para la remodelación (degradación) de la MEC requerida para el paso de los leucocitos a través de la misma.

I.6 Interacción sistema inmune – matriz extracelular

Durante diversos procesos, como infecciones bacterianas, daño físico, migración celular, remodelación tisular y lesiones, se generan oligopéptidos derivados de las proteínas de la MEC, los cuales, al ser reconocidos por las células del sistema inmune, pueden funcionar como agentes proinflamatorios(22, 33). Para que se lleve a cabo una respuesta inflamatoria exitosa, es necesario la actividad de una serie de estímulos multifactoriales que implican la liberación de mediadores solubles, el reclutamiento y la activación de células inflamatorias(34).

La inflamación es una de las estrategias mejor estudiadas del sistema inmune innato. Los sistemas de respuesta del sistema inmune innato, se basan en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por receptores celulares de reconocimiento de patrón (PRRs), que tienen la habilidad de inducir la producción de

citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas coestimuladoras(35). Entre los PRRs mejor caracterizados están los receptores tipo Toll (TLR)(36), los cuales pueden reconocer tanto moléculas de bacterias (TLR4 reconoce lipopolisacárido, TLR2 dimerizado con TLR1 o TLR6 reconocen peptidoglicana, lipopéptido y lipoproteína de bacterias Gram-positivas y lipopéptido de micoplasmas; TLR5 reconoce flagelina bacteriana), componentes de virus (TLR9 reconoce CpG del DNA, TLR3 reconoce RNA de doble cadena y TLR7 RNA de cadena sencilla)(37)(38) e incluso ligandos de tipo sintético (TLR7 moléculas tipo imidazoquinolinas)(35). Una vez realizado el reconocimiento del PAMP correspondiente, los TLRs activan diversas vías de señalización, en las que pueden o no participar MyD88 (Gen 88 primario de la respuesta de la diferenciación mieloide) proteína adaptadora para una de las vías de señalización de TLRs, y activar a su vez moléculas como NF- κ B. Este factor de transcripción en realidad forma parte de una extensa familia de factores de transcripción que se diferencian entre sí por las subunidades que lo forman. Así, existen NF- κ B formados por heterodímeros de subunidades p50/p65 con actividad proinflamatoria al inducir la activación de los genes de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-12(39), así como homodímeros p50/p50 con actividad anti-inflamatoria, entre otros⁶⁴. Por otro lado, los TLRs pueden activar otras vías de señalización que inducen respuestas antivirales mediante la secreción de IFN tipo I (IFN α múltiple e IFN β sencillo)(36).

Además del efecto que la activación de los TLRs tienen sobre la expresión de genes proinflamatorios, se ha demostrado que las células neoplásicas que expresan TLR 4, al reconocer al LPS y mediante la activación de NF- κ B, induce la expresión de integrinas β 1, lo cual, durante el proceso de metástasis, les facilita la infiltración de tejidos al aumentar su adherencia a colágena tipo I, fibronectina y laminina(40). En otro reporte, se encontró que la exposición de monocitos de ratón a peptidoglicana, ligando de TLR 2, induce en estos, la expresión de integrinas β 2, lo cual les permite aumentar su adherencia y facilitar su migración durante un proceso inflamatorio(41).

Además de los PAMPs, los TLRs y otros PRRs pueden identificar a moléculas asociadas con daño (DAMPs) que se secretan como señales de alarma ante una agresión al organismo e inducen mecanismos orientados primordialmente a recuperar la homeostasis(42). Varios componentes de la MEC al ser degradados durante las infecciones o los procesos de remodelación tisular pueden funcionar como DAMPs(33). La hialuronana forma parte de la MEC y es un polímero de alto peso molecular, el cual, al

ocurrir daño tisular (por estímulos físicos o invasiones bacterianas) es degradado a oligopéptidos, que pueden ser reconocidos por una glicoproteína transmembranal tipo 1, conocida como CD44, que favorece los procesos de reparación de heridas, reclutamiento de células T y neutrófilos al sitio de inflamación así como la activación de macrófagos y células endoteliales e incluso en procesos patológicos puede favorecer el crecimiento y metástasis tumoral(43). Los fragmentos de hialuronana también pueden ser reconocidos por TLR 4 y 2 e inducir la producción de IL-1 β y TNF- α (43). Los complejos de hialuronana de alto peso molecular pueden inhibir la apoptosis por los mismos TLRs al activar la vía de señalización por NF- κ B(33). En otro ejemplo, el biglicano (un proteoglicano de MEC) y la fibronectina pueden ser reconocidos por el TLR 4 e inducir la secreción de citocinas proinflamatorias(33, 43), que pueden también tener actividad quimiotáctica.

I.7 Matriz extracelular y psoriasis

La primera estructura de la MEC con la que entran en contacto las células después de extravasarse, es la membrana basal del endotelio vascular, la cual tiene como proteína más abundante a la colágena tipo IV(44). Una vez en la piel, las células entrarán en contacto con la matriz extracelular de la epidermis, cuyo principal componente es la colágena tipo I. Posteriormente, al migrar hacia la epidermis, las células entrarán en contacto de nuevo con la membrana basal de la unión dermo-epidérmica, en donde, de nueva cuenta encontrarán colágena tipo IV (Fig. 2)(28, 29). Se ha encontrado que la membrana basal de la unión dermo-epidérmica en la piel psoriásica no tiene la misma integridad que la de una piel sana, debido a una ruptura de la red de colágena tipo IV y laminina, mediada por el crecimiento exacerbado de los queratinocitos y la secreción de MMP 2(45).

Por otro lado, en un estudio reciente, Conrad y colaboradores en 2007, reportan que en psoriasis, la integrina que reconoce a la colágena tipo IV(46), la integrina α 1 β 1, se encuentra sobre-expresada en los linfocitos de sujetos psoriásicos, y en un modelo de trasplante de piel psoriásica a ratón, el bloqueo de esta integrina disminuye la papilomatosis, y la expresión del transcrito de IL-8 y como consecuencia el reclutamiento de nuevas células a la piel(19). Este es el primer reporte en donde se encuentra una

relación entre el reconocimiento de matriz extracelular y la modulación de los procesos inflamatorios en psoriasis.

Correspondientemente, en nuestro grupo de trabajo al explorar si la capacidad de secreción de citocinas ante LPS se modificaba en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) expuestas o no a colágena I y IV, encontramos que en los sujetos con psoriasis el contacto con colágena IV, favorece la producción de IL-1 β ; mientras que la producción de IL-10, está disminuida en los sujetos psoriásicos respecto a los sanos, en quienes, además, el contacto con colágena incrementa la secreción de esta citocina con efectos anti-inflamatorios. De forma contrastante con esto, la producción de TNF- α se incrementa ante la estimulación con LPS, pero no ante la estimulación con colágena IV que parece abate esta producción(47). Esto podría estar relacionado con un primer reconocimiento de colágena por integrinas, que favorecería la señalización hacia NF- κ B para la síntesis de las MMPs y expresión de más integrinas y posiblemente de TLRs cuya señalización podría perpetuar la respuesta inflamatoria observada en la psoriasis. Además, las MMPs podrían generar fragmentos de MEC que al funcionar como DAMPs podrían a su vez aumentar la respuesta inflamatoria local por su reconocimiento por diferentes PPRs.

I.8 Justificación

La psoriasis es una enfermedad que compromete significativamente la calidad de vida de los sujetos que la padecen. Evidentemente hay factores genéticos involucrados en su desarrollo, así como también es evidente que se requiere de la infiltración de leucocitos para generar y perpetuar las placas psoriásicas. Existen algunas evidencias que sugieren que el reconocimiento de componentes de la MEC como las colágenas, pueden favorecer la activación de células proinflamatorias, aunque no queda claro cuales serían los mecanismos por los que el contacto con colágenas podría inducir la expresión diferencial de citocinas por los leucocitos infiltrantes hacia piel (e incluso otros tejidos afectados, como uñas y sinovias), ni si estarían involucrados en estos procesos receptores como los TLRs, factores de transcripción como NF- κ B y la activación de MMPs que pudieran generar DAMPs que perpetúen la respuesta inflamatoria en las lesiones psoriásicas.

I.9 Hipótesis

Las células mononucleares de sangre periférica de sujetos psoriásicos, en comparación con las de sujetos no psoriásicos, al entrar en contacto con colágena tipo I y IV, favorecen la expresión de TLR4, la activación de NF- κ B, la activación de MMPs y la expresión de genes proinflamatorios.

I.10 Objetivos

Objetivo general.

Determinar la participación de las colágenas IV y I, en la expresión y señalización de PPRs, la activación de MMPs y la expresión de genes proinflamatorios en células mononucleares *in vitro*.

Objetivos particulares.

Determinar la expresión de TLR 2 y TLR 4 en células circulantes CD14⁺⁺ (monocitos) de sujetos psoriásicos y no psoriásicos activadas con LPS y preincubadas con colágena.

Determinar la capacidad de señalización de los TLR 4 mediante la determinación de NF- κ B activo en células mononucleares de sangre periférica de sujetos psoriásicos y no psoriásicos expuestos a colágena y/o activadas con LPS.

Determinar MMPs activas derivadas de CMSP de sujetos psoriásicos y sanos expuestas a colágena IV y I y si su actividad puede modular la expresión de TLR 4.

Identificar por microarreglos de expresión genes que se expresen diferencialmente al exponer a colágena IV o LPS, células mononucleares de sangre periférica de sujetos psoriásicos con respecto a sujetos no psoriásicos.

II. Metodología

II.1 Grupos de estudio

Para el estudio se tomaron en cuenta dos grupos:

Grupo control: sujetos sanos

Grupo problema: sujetos psoriásicos.

Para el grupo control se seleccionaron sujetos sanos, pareados por edad y sexo a los sujetos con psoriasis.

Los sujetos con psoriasis se diagnosticaron y reclutaron por especialistas médicos en el “Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua”.

De cada sujeto participante se obtuvo el consentimiento informado por escrito.

II.2 Criterios de Selección de sujetos

Criterios de Inclusión

- Sujeto de entre 18 y 50 años.
- Sexo indistinto.
- Diagnóstico de psoriasis en placa (exclusivo para el grupo problema).
- Firma de consentimiento informado.

Criterios de no Inclusión

- Mujeres embarazadas.
- Antecedentes personales de enfermedades autoinmunes.
- Encontrarse en tratamiento inmunomodulador y/o inmunosupresor.
- Presentar cualquier enfermedad que comprometa la respuesta inmune.

Criterios de Exclusión

- Retirar el consentimiento informado.
- Presentar leucopenia o leucocitosis.
- Coagulación o hemólisis de la muestra sanguínea.

Carta de consentimiento informado

México D.F. a _____ del 200_

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:
“Participación de componentes de matriz extracelular en la respuesta inflamatoria de sujetos con psoriasis”

Registrado ante el Comité Local de Investigación o la Comisión Nacional de Investigación Científica con el número:

El objetivo del estudio es establecer si los componentes de matriz extracelular modifican la respuesta pro-inflamatoria, favoreciendo así la formación de las placas psoriásicas. El dilucidar estos mecanismos podrá favorecer en un futuro el desarrollo de alternativas de tratamiento más seguras y efectivas.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en donar una muestra de 10 mL de sangre periférica obtenida por venopunción.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

- Posible molestia en el brazo derivado de la punción
- Beneficio indirecto. Contribuir a la dilucidación de la patología de las lesiones psoriásicas

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Nombre, firma y matrícula del investigador responsable

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: 56-27-69-00 ext. 21476 ó 56-27-69-15

Testigos:

II.3 Toma de muestra de sangre periférica.

Se obtuvieron 15 mL de sangre periférica por punción de la vena humeral, previa asepsia y antisepsia. La sangre se colectó en tubos estériles con sistema vacutainer que contenían 30 UI de heparina de litio liofilizada como anticoagulante.

II.4 Aislamiento de CMSP mediante gradiente de Ficoll

El volumen de sangre obtenido se diluyó en relación 1:1 con regulador de fosfatos (PBS, pH 7.4). Esta suspensión se colocó cuidadosamente con una pipeta de transferencia sobre una fase de ficoll. En este caso se utilizó la preparación comercial lymphoprep (Fresenius Kabi Norge AS para Axis Shield) dentro de un tubo de polipropileno (Neptune CLP Ref. 2543), evitando mezclar las fases en relación 1:3 con la suspensión celular.

A continuación se centrifugaron los tubos a 1062 x g, con los valores de aceleración y frenado en 1 y 0 respectivamente por 20 min.

Terminado el tiempo de centrifugación, en condiciones de esterilidad, se extrajo cuidadosamente la capa correspondiente al concentrado de CMSP.

El concentrado celular recuperado se lavó agregando de 10 a 12 mL de PBS estéril 1X y se centrifugó a 382 x g por 5 minutos. Posteriormente se retiró el PBS por decantación y se repitió el procedimiento de lavado con PBS dos veces más. Finalmente el botón celular se resuspendió en un mL de medio RPMI sin suero y se procedió a la verificación de la viabilidad y la densidad celular con azul de tripano.

II.5 Verificación de la viabilidad celular

Se realizó una dilución 1:10 con la suspensión de CMSP en una solución de azul de tripano al 1%. Se homogeneizó la mezcla por agitación en un vortex (Velp Scientifica) por 3 s, y se colocó en la cámara de Neubauer 10 µL de la dilución y a continuación se observó en un microscopio óptico (Bausch & Lomb). Se cuantificaron las células viables difractantes y las no viables de color azul y opacas. Una vez contabilizados los cuatro cuadrantes se determinó el número de células de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células/ml} = \text{promedio de células en los cuadrantes} \times \text{volumen de la cámara} \\ (10000 \text{ mm}^3) \times \text{dilución en azul de tripano (10)}$$

De acuerdo al número de células obtenidas se ajustó el volumen de la suspensión agregando RPMI necesario para tener una densidad de 2×10^6 células/mL utilizada en los ensayos de estimulación.

II.6 Recubrimiento de placas con colágena tipo I y tipo IV

El recubrimiento de los pozos de las placas de cultivo de 24 pozos de poliestireno (Corning Inc. Cat. No. 3526) se realizó en condiciones de esterilidad, colocando 200 μ L de regulador de carbonatos a pH 9, NaHCO_3 35 mM (J. T. Baker) y Na_2CO_3 15 mM (Mallinckrodt) en agua destilada y de las soluciones de colágena tipo IV (Sigma) y colágena tipo I (Sigma) a una concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en regulador de carbonatos. Las placas se incubaron a 8 °C por 16 h y posteriormente por aspiración se retiró el exceso de solución. Se agregaron a continuación 200 μ L de solución balanceada de Hank para restaurar el pH del pozo de cultivo (pH 7), la cual también se retiró de los pozos por aspiración. Una vez recubiertas las placas, se almacenaron en refrigeración a 8° C hasta su utilización.

II.7 Estimulación de CMSP.

II.7.1 Para los ensayos de expresión de TLRs

Se colocaron 250 μ L de la suspensión de CMSP (2×10^6 células/mL) en cada pozo de una placa de 24 pozos con alguna de las siguientes condiciones:

- ▶ SE: Incubación sin estímulo.
- ▶ LPS: Incubación de 12 h sin estímulo y agregar posteriormente de lipopolisacárido (LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como estímulo por 4 horas.
- ▶ Col IV: Incubación en el pozo recubierto con colágena tipo IV durante 16 h.
- ▶ Col IV / LPS: Incubación en el pozo recubierto con colágena tipo IV por 12 h y agregar LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como estímulo por 4 h.
- ▶ Col I: Incubación en el pozo recubierto con colágena tipo I durante 16 h.
- ▶ Col I / LPS: Incubación en el pozo recubierto con colágena tipo I durante 12 h y agregar posteriormente 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS como estímulo por 4 h.

Las incubaciones se realizaron a 37° C, 80% de humedad y 5% de CO₂ y posteriormente se colectaron las células de cada pozo para su análisis.

II.7.2 Para los ensayos de activación de NF-κB

Se colocaron 250 µL de la suspensión de CMSP (2x10⁶ células/mL) en cada pozo de una placa de 24 pozos con alguna de las siguientes condiciones:

- ▶ SE: Incubación sin estímulo.
- ▶ LPS: Incubación de 5, 15 y 30 min con 1µg/mL de LPS como activador.
- ▶ Col IV: Incubación en pozo con colágena IV durante 5, 15 y 30 min.

Las incubaciones se realizaron a 37° C, 80% de humedad y 5% de CO₂ y posteriormente se colectaron las células para separar sus núcleos.

II.7.3 Para los ensayos con el inhibidor de actividad de MMPs

Se colocaron 1.5x10⁶ CMSP en cada pozo de una placa de 24 pozos con alguna de las siguientes condiciones:

- ▶ L-Lys: Incubación por 14 h con el polipéptido de lisina como control negativo.
- ▶ L-Lys GM6001: Incubación de 14 h en L-Lys con el inhibidor GM6001 (40 µg/ml).
- ▶ Col IV: Incubación en el pozo recubierto con colágena tipo IV durante 14 h.
- ▶ Col IV/GM6001: Incubación en el pozo recubierto con colágena tipo IV y con el inhibidor GM6001 (40 µg/ml). por 14 h.
- ▶ Col I: Incubación en el pozo recubierto con colágena tipo I durante 14 h.
- ▶ Col I/GM6001: Incubación en el pozo recubierto con colágena tipo I con el inhibidor GM6001 (40 µg/ml) por 12 h.

Las incubaciones se realizaron a 37° C, 80% de humedad y 5% de CO₂ y posteriormente se colectaron los sobrenadantes en tubos con 10 µl del inhibidor de serinproteasas (PMSF) y se almacenaron a -70°C. Las células se colectaron y se fenotipificaron según el procedimiento de determinación de la expresión de TLR 4 por citometría de flujo.

II.8 Determinación de la expresión de TLR 4 por citometría de flujo

Una vez transcurrido el tiempo de estimulación establecido, se colocaron 5×10^5 CMSP en un tubo de poliestireno, falcon de 5 mL para citometría de flujo (BD Cat. 352058) en presencia o ausencia de los anticuerpos monoclonales anti CD14 (Ficoeritrina ciano 5 PE-Cy5), anti TLR 2 (Isotiocianato de fluoresceína FITC) y anti TLR 4 (Alofocianina APC) durante 15 min.

Una vez transcurridos los 15 min de incubación se realizó una segunda incubación con 150 μ L de la solución fijadora y permeabilizadora FACS Lysing solution 1X a base de paraformaldehído (Becton Dickinson San José, CA, USA) por 10 min. A continuación se realizó un lavado agregando 1 mL del regulador de fosfatos 1X y se centrifugó a $1062 \times g$ por 5 minutos. Al finalizar el centrifugado, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 70 μ L de PBS 1X y se analizaron utilizando un Citómetro de flujo FACS Aria (BD), y el programa FACS Diva versión 4.1.2 (BD).

II.9 Identificación de NF- κ B activo

II.9.1 Separación de núcleos para identificación de NF- κ B activo

Una vez realizada la estimulación celular, se colectaron 1.5×10^6 células mononucleares en un tubo de 1.5 mL y se centrifugaron a $2100 \times g$ por 5 min a $4^\circ C$. Se retiró el sobrenadante con precaución y se colocó el sedimento celular a $-70^\circ C$ por 10 min. A continuación el botón se resuspendió en 100 μ L de regulador hipotónico (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM y DTT 1 mM) para disgregar las células y extraer los núcleos. Se evaluó la integridad de los núcleos al microscopio con azul de tripan (1:10) (Los núcleos son estructuras redondas y azules). Se centrifugó el resto celular a $500 \times g$ por 10 min y $4^\circ C$ para recuperar los núcleos. Se retiró con precaución el sobrenadante por aspersion y se añadieron 100 μ L de PBS A (paraformaldehído al 4%) frío para fijar los núcleos. Se almacenaron los núcleos a $4^\circ C$ hasta por 1 día o se realizó la tinción para citometría.

II.9.2 Identificación de NF-κB translocado a núcleo por citometría de flujo

Los núcleos extraídos se centrifugaron a 1200 x g a 4° C por 1 min y se retiró con precaución el sobrenadante por aspiración. Los núcleos se resuspendieron en 100 μL de la solución permeabilizadora PBS B (0.1% tritón X-100 + paraformaldehído 4%), y se incubaron 10 min en hielo. A continuación se centrifugaron a 1200 x g a 4° C por 1 min y el sobrenadante se retiró por aspiración. Los núcleos se resuspendieron en 500 μL de PBS C (SFB 4%) frío y se mantuvieron por 20 minutos en hielo. El contenido se separó en tres tubos, dos para la tinción de NF-κB fracción p50 y p65 y otro como blanco (autofluorescencia). Se centrifugaron a 1200 x g a 4° C por 1 min y se resuspendieron en 100 μL de PBS C frío con 2.5 μg/mL del anticuerpo anti-NF-κB p50 acoplado a ficoeritrina (PE) y otro con anti-NF-κB p65/PE o sin anticuerpos (tubo de autofluorescencia), los cuales se incubaron en hielo por 20 min y posteriormente se lavó con 500 μL de PBS C, agitando el tubo manualmente para mezclar. Se centrifugó a 1200 x g a 4° C por 1 min y se retiró el sobrenadante por aspersion para después resuspender en 100 μL de PBS C frío con 3 μL de los anticuerpos isotipo (tubo de tinción) o sin anticuerpos (tubo de autofluorescencia) e incubar 20 min en hielo. Se realizó un lavado con 500 μL de PBS C, agitando el tubo manualmente para mezclar y se centrifugó a 1200 x g a 4° C por 1 min. Se retiró el sobrenadante por aspiración para posteriormente resuspender el botón en 400 μL de PBS D (1% paraformaldehído)⁴⁴. Se realizó el análisis de las muestras en el citómetro CyAn ADP (Dako), utilizando el software Summit 4.1.

II.9.3 Identificación de NF-κB p65 activo en células

Una vez que se estimularon las células, se tomaron al menos 5×10^5 células, para realizar la fenotipificación de moléculas de superficie (anticuerpo anti CD14 acoplado a Tricolor). Una vez terminado el marcaje de superficie, se centrifugaron las células a 382 x g por 5 min, para luego resuspender el botón en 500 μL de PBS con paraformaldehído al 1% y se incubaron por 10 min a 37°C. Terminada la incubación, los tubos se colocaron en hielo por 1 min. Posteriormente se centrifugaron las células a 382 x g por 5 min. y se retiró el sobrenadante. Los botones se resuspendieron en 100 μL de PBS y se agregó metanol frío lentamente y agitando el tubo hasta que se completó un volumen de 90% en metanol. Por último se incubaron las células por 30 min. en hielo y se congelaron a -20°C.

Para la detección de NF-κB p65 se centrifugaron las células a 382 x g por 5 min, se retiró el sobrenadante y luego se tomaron aproximadamente 5×10^5 células mononucleares

por tubo, y se añadió 1 mL del regulador de incubación a cada tubo (PBS con albúmina al 2.5%) y se centrifugaron a 382 x g por 5 min. A continuación se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 90 µL del regulador de incubación, para incubar por 10 min. a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 10 µL del anticuerpo anti NF-κB fosfo p65 por tubo (dilución 1:10 en PBS) y se incubaron por 1 hora. Una vez terminada la incubación se añadieron 500 µL del regulador de incubación y se centrifugaron a 382 x g 5 min. Por último, las células se resuspendieron las células en 150 µL de PBS para analizar en el citómetro.

II.10 Preparación de zimogramas para detección de MMPs activas

Se estimularon las CMSP de sujetos psoriásicos de acuerdo al esquema de estimulación descrito previamente. Se tomaron 3 µL del sobrenadante como volumen de carga en el gel para colocarlo 1:1 con el regulador de carga por 40 min. El gel de poliacrilamida al 8% fue adicionado con gelatina (Sigma) al 1% para poder observar la actividad gelatinolítica. La electroforesis se realizó a 72 V durante 3 h a 4 °C, para posteriormente lavar el gel con Tritón X-100 al 2.5% y permitir la actividad de la MMP en un regulador de activación a 37° C por 36 h. El revelado se realizó con azul de Coomassie. Adicionalmente, se utilizó el inhibidor de actividad de MMPs GM6001 (40 µg/mL). El gel se analizó por densitometría en el programa ImageJ 1.42q (Wayne Rasband NIH, USA).

II.11 Preparación de muestras para los microarreglos de expresión

Muestras de sangre periférica se tomaron como previamente se describió, en tubos vacutainer heparinizados y de la misma manera se separaron las células por gradiente de ficoll y posteriormente se incubaron las células como se describe en el punto II.7.1, pero únicamente bajo 3 condiciones: sin estímulo (SE), estimuladas con LPS (LPS) e incubadas solo con colágena tipo IV (Col IV). Una vez terminada la estimulación, se extrajo el RNA y se conservó en la solución de RNA Later (Ambion), para su procesamiento posterior. Las muestras de RNA enviaron para su análisis por microarreglos de expresión al Southwest Foundation en San Antonio Texas al laboratorio de la Dra. Laura Cox utilizando el chip de expresión de genes humanos 1.1 (Affymetrix Inc., Santa Clara CA, USA).

III. Resultados

III.1 Expresión de TLRs en las células CD14+ de sujetos sanos y sujetos psoriásicos

El análisis de la expresión de TLR 2 y 4 en la superficie de monocitos se realizó de la siguiente forma: a partir de una gráfica de tamaño(FS) vs granularidad(SSC), se seleccionó la población correspondiente a las células mononucleares completas y de estas se seleccionaron a las células que fueran CD14++ (células positivas a PE-Cy5), correspondiente a monocitos. De esta última población seleccionada, se determinó la expresión tanto de TLR2 como de TLR4 (Figura 4).

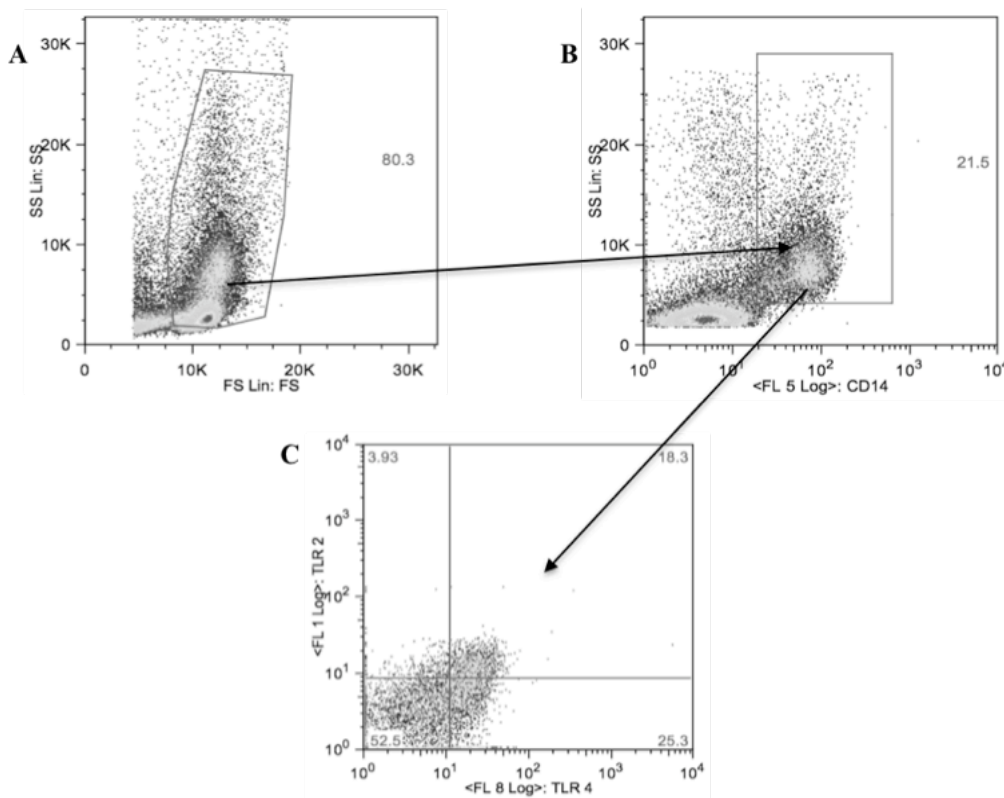


Figura 4. Selección de poblaciones de células mononucleares de sangre periférica para el análisis de la expresión de TLRs. A partir de una gráfica de tamaño contra granularidad se seleccionó la población correspondiente a las células mononucleares (A). De esta selección, se obtuvieron las células CD14+ correspondientes a los monocitos (B). De la población de células CD14+ se obtuvieron ahora las células que expresaban TLR 2, TLR 4 o ambos (C).

Al analizar la expresión de TLR2 en la superficie de monocitos, encontramos que una mayor proporción de monocitos provenientes de sujetos sanos ($n = 5$) resultaron positivos a este receptor en comparación con los monocitos de sujetos psoriásicos ($n = 9$) (41 ± 7.404 %vs. 32.3 ± 5.858 %, $p = 0.0312$) (Figura 5A). Adicionalmente, al normalizar respecto al basal de cada sujeto, observamos que en todas las condiciones de estimulación, en los pacientes con psoriasis aumenta la proporción de células que expresan TLR2, a diferencia de los sujetos sanos donde no aumenta, e incluso disminuye la proporción de células TLR2+ con los estímulos de LPS (1.9 ± 1.048 vs. -0.74 ± 0.969 , $p = 0.0665$) y Col I con LPS (3.644 ± 2.008 vs. -2.86 ± 3.419 , $p = 0.1999$). En el caso de la estimulación con Col I el incremento de psoriásicos vs sanos resultó estadísticamente significativo (1.733 ± 1.406 vs. -4.62 ± 3.574 , $p = 0.0384$). (Figura 5B).

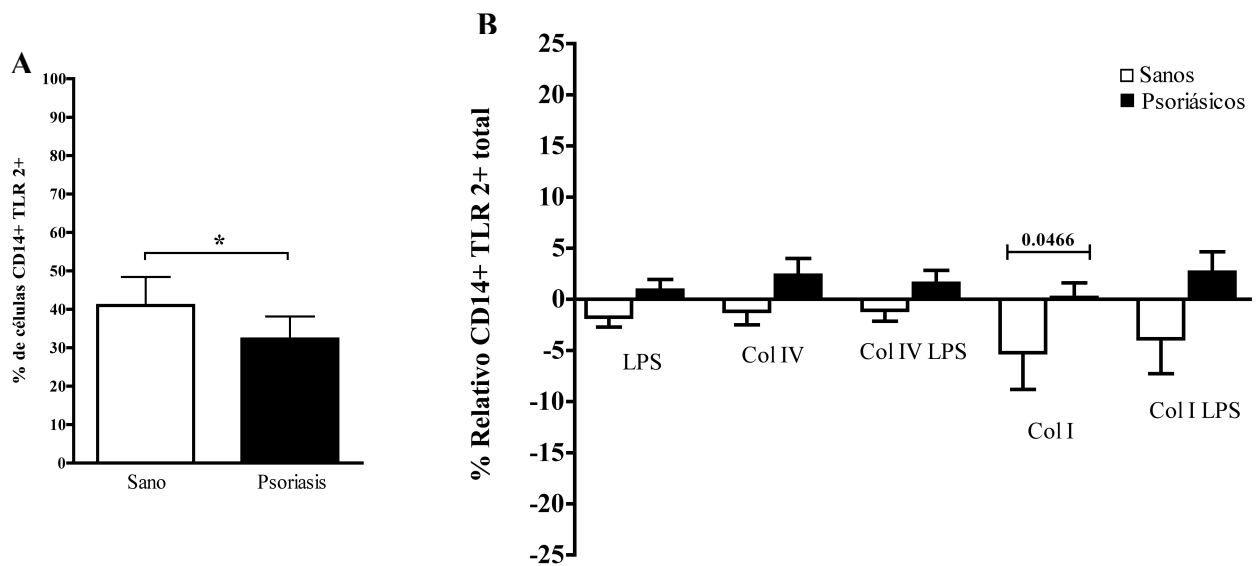


Figura 5. Expresión de TLR 2 en monocitos de sujetos sanos □ y psoriásicos ■.

A) Se presenta la expresión sin estímulo de TLR 2 en células CD14+ de sujetos sanos y psoriásicos. B) A partir del valor de monocitos TLR2+ en la condición SE de cada sujeto, se normalizaron los valores tomándolo como cero, en las siguientes condiciones de estimulación: SE: sin estímulo, LPS: Lipopolisacárido, Col IV: Colágena tipo IV, Col IV LPS: Colágena tipo IV con lipopolisacárido, Col I: Colágena tipo I y Col I LPS: Colágena tipo I con LPS (B). Las barras representan los valores promedios y el error estándar. Prueba estadística *t* de student pareada ($p > 0.05$).

En cuanto a la expresión de TLR 4 encontramos que en los monocitos que los porcentajes de expresión en células sin estimular (SE) son muy similares entre las células de sujetos psoriásicos (n = 9) y sanos (n = 5) ($58.88 \pm 8.602\%$ vs. $64.65 \pm 5.176\%$, respectivamente) (Figura 6A). Ahora bien, al normalizar respecto a la condición SE (como en el análisis de expresión de TLR2), en el caso de las células de sujetos sanos hay una evidente disminución en el porcentaje de células que expresan TLR 4, a diferencia de las células de sujetos psoriásicos donde en todas las condiciones de estimulación, se incrementa el porcentaje de células que expresan TLR4. A excepción de LPS ($-8.66\% \pm 5.01$ vs. $5.73\% \pm 5.68$; $p = 0.088$), en el resto de las condiciones el incremento en la expresión de TLR4 en los monocitos de sujetos psoriásicos respecto a sanos es estadísticamente significativo. (Col IV, $-9.63\% \pm 4.95$ vs $7.28\% \pm 5$; $p = 0.025$), Col IV con LPS ($13.37\% \pm 5.25$ vs $-12.58\% \pm 7.402$; $p = 0.0199$), con Col I ($12.84\% \pm 4.69$ vs $-11.54\% \pm 2.738$; $p = 0.0014$) y con Col I con LPS ($10.21\% \pm 6.29$ vs $-9.68\% \pm 3.66$; $p = 0.0267$) (Figura 6B).

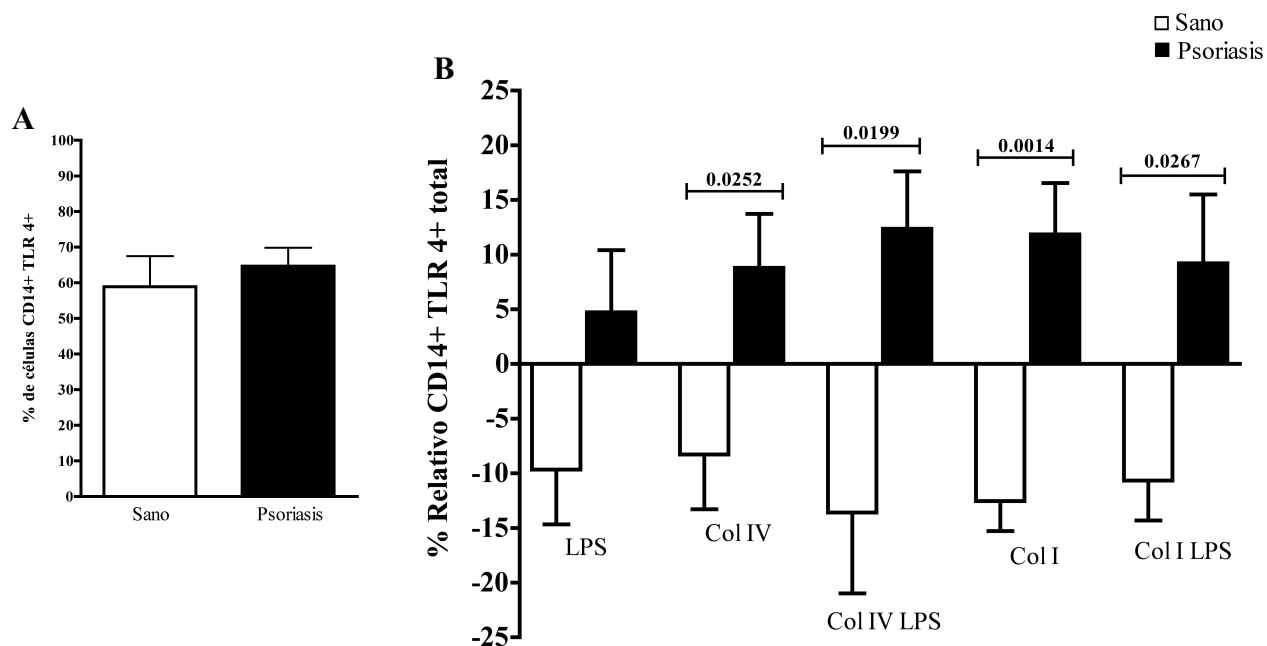


Figura 6. Expresión de TLR 4 en monocitos de sujetos sanos □ y psoriásicos ■.

A) Se presenta la expresión sin estímulo de TLR 4 en células CD14+ de sujetos sanos y psoriásicos. B) A partir del valor de monocitos TLR4+ en la condición SE de cada sujeto, se normalizaron los valores de expresión tomándolo como cero para las siguientes condiciones de estimulación: SE: sin estímulo, LPS: Lipopolisacárido, Col IV: Colágena tipo IV, Col IV LPS: Colágena tipo IV con lipopolisacárido, Col I: Colágena tipo I y Col I LPS: Colágena tipo I con LPS. Las barras representan los valores promedios y el error estándar. Prueba estadística *t* de student pareada ($p > 0.05$).

III.2. Expresión de TLRs en las células CD14+ de sujetos sanos y sujetos psoriásicos tratadas con el inhibidor de actividad de metaloproteinasas

Dado que las colágenas pueden ser reconocidas directamente mediante integrinas o bien fragmentadas por PPRs, exploramos si la actividad de MMPs es necesaria en el efecto que el contacto con colágena tiene sobre la expresión de TLRs en monocitos. Empleando el inhibidor de la actividad de metaloproteinasas GM6001, repetimos los ensayos de estimulación de monocitos con colágena y verificamos la expresión de TLR4 en células CD14+. Como se puede observar en la figura 7 la expresión de TLR 4 disminuye en todas las condiciones en las que se utilizó GM6001 tanto para las células CD14+ de sujetos sanos como para las de psoriásicos sin encontrar diferencias significativas entre los sujetos.

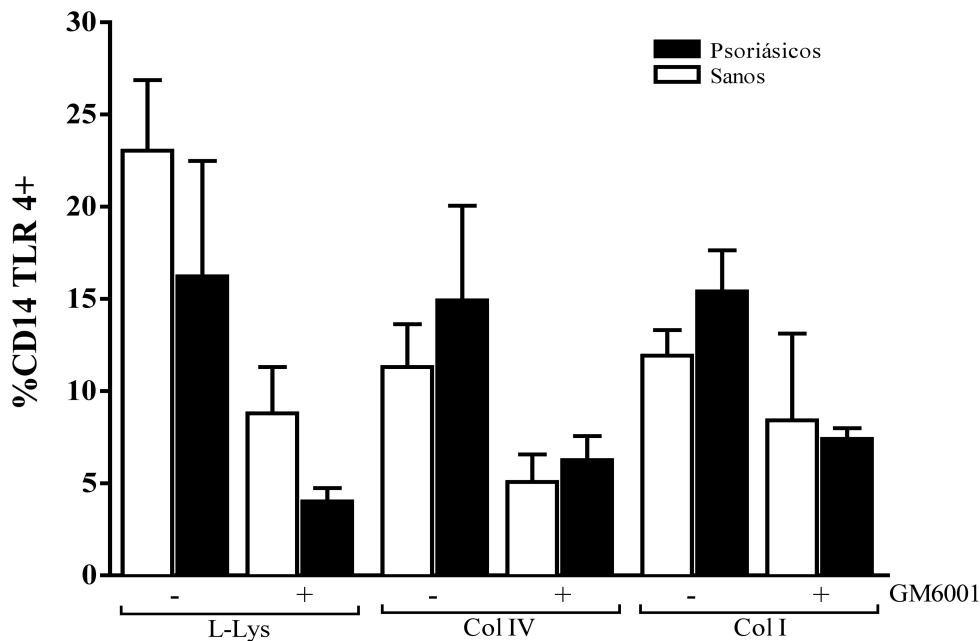


Figura 7. Expresión de TLR 4 en células CD14+ de sujetos sanos y psoriásicos en presencia del inhibidor de MMPs GM6001.

Se presenta la expresión de TLR 4 en células CD14+ de sujetos sanos (n = 3) □ y psoriásicos (n = 3) ■ bajo las siguientes condiciones de estimulación: L-Lys: Poli-L-Lys, Col IV: Colágena tipo IV, Col I: Colágena tipo I con o sin GM6001. Las barras representan los valores promedios y el error estándar. Prueba estadística *t* de student pareada ($p > 0.05$).

Cuando las células se encontraron con L-Lys la expresión de TLR 4 fue mayor en los sanos que en los psoriásicos sin GM6001 ($23.03 \pm 3.832\%$ vs $16.22 \pm 6.261\%$, $p = 0.0570$) y con GM6001 ($8.793 \pm 2.506\%$ vs $4.010 \pm 0.7223\%$, $p = 0.0590$). Por el contrario, cuando las células se encontraron con Col IV sin GM6001 ($11.31 \pm 2.324\%$ vs

14.92 ± 5.130%, p = 0.1767), con GM6001 (5.067 ± 1.490% vs 6.253 ± 1.306%, p = 0.3450) y con Col I sin GM6001 (11.92 ± 1.379% vs 15.40 ± 2.234%, p = 0.1928) y con GM6001 (8.410 ± 4.702% vs 7.403 ± 0.5738%, p = 0.4180) el porcentaje fue mayor en las células de sujetos psoriásicos que en los sanos.

III.3 Verificación de la actividad de metaloproteinasas producidas por CMSP de sujetos con psoriasis y sanos expuestos a colágena tipo I y tipo IV por zimografía.

Al observar el efecto que la inhibición de las MMPs tiene sobre la expresión de TLRs en monocitos nos preguntamos si habrá diferencias en la capacidad de secreción de las MMPs por las células mononucleares al contacto con colágena tipo IV y tipo I, y determinamos entonces MMPs activas en los sobrenadantes mediante un zimograma. Tal como se evidencia en la figura 8 y se comprobó con el análisis densitométrico de los tres sujetos y controles analizados con esta técnica, mismo las CMSP de sujetos psoriásicos secretan una mayor cantidad de MMP 9 activa cuando se encuentran en contacto con la colágena tipo I y tipo IV que las CMSP de sujetos sanos. Como se esperaba, esta actividad de MMP9, disminuye en presencia del inhibidor de MMPs GM6001 en muestras de sujetos sanos y con psoriasis.

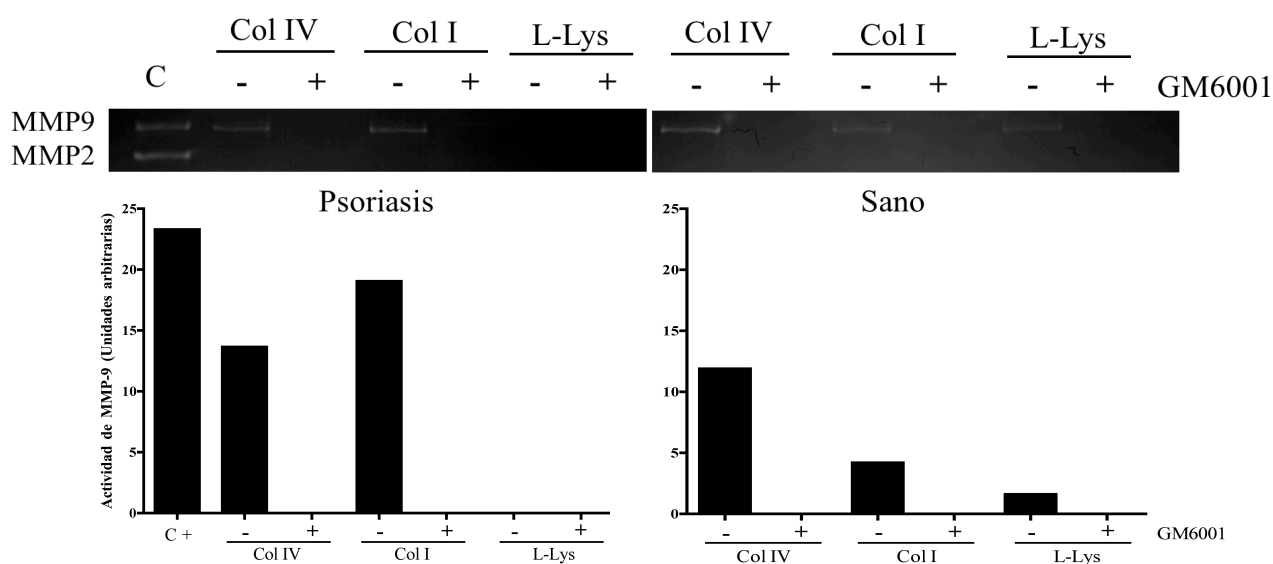


Figura 8. El contacto con colágena IV y I induce mayor activación de MMP9 en CMSP de sujetos psoriásicos. Se muestra un zimograma representativo (de una serie de tres) y su análisis densitométrico utilizando sobrenadantes de CMSP de un sujeto con psoriasis y uno sano estimulados con colágena tipo IV, tipo I y poli L-lisina. Tanto en presencia como ausencia del inhibidor de MMPs GM6001.

III.4. Detección de NF- κ B activo en núcleos de CMSP estimuladas con LPS por citometría de flujo

Como paso inicial, se llevo a cabo una cinética de estimulación de células mononucleares de sujetos sanos para conocer el tiempo óptimo para la detección de las fracciones p50 y p65 de NF- κ B translocadas a núcleo. Mediante el aislamiento de los núcleos y la utilización de anticuerpos específicos anti-p50 y anti-p65 se determinó la actividad de NF- κ B en células mononucleares de tres sujetos sanos y de cuatro sujetos psoriásicos, fueron estimuladas con LPS (1 μ g/mL) durante 5, 15 y 30 min. Como se puede observar las CMSPs de sujetos psoriásicos presentan mayor activación de NF- κ B (evidenciada por su translocación a núcleo) en ambas fracciones p50 (Figura 9A) y p65 (Figura 9B) que las CMSP de sujetos sanos, desde 5 min de activación con LPS en comparación con la activación del sujeto sano para p50 ($29.28 \pm 7.131\%$ vs. $4.98 \pm 2.74\%$, $p = 0.0571$) y p65 ($30.03 \pm 6.699\%$ vs. $4.220 \pm 1.620\%$, $p = 0.0598$). A los 15 min observamos una ligera disminución de ambas subunidades para los sujetos psoriásicos y en comparación de los sanos que incrementan tanto p50 ($27.23 \pm 7.55\%$ vs $15.83 \pm 9.596\%$, $p = 0.2286$) como p65 ($19.06 \pm 5.802\%$ vs $6.405 \pm 0.8950\%$, $p = 0.1909$). En contraste, las fracciones de NF- κ B en los núcleos de células de sujetos sanos se encontraron en porcentajes significativos hasta los 30 minutos para p50 ($30.15 \pm 6.755\%$ vs. $19.73 \pm 4.425\%$, $p = 0.400$) y para p65 ($28.62 \pm 12.05\%$ vs. $8.99 \pm 1.91\%$, $p = 0.2979$) aunque siempre en menor porcentaje que para los sujetos psoriásicos.

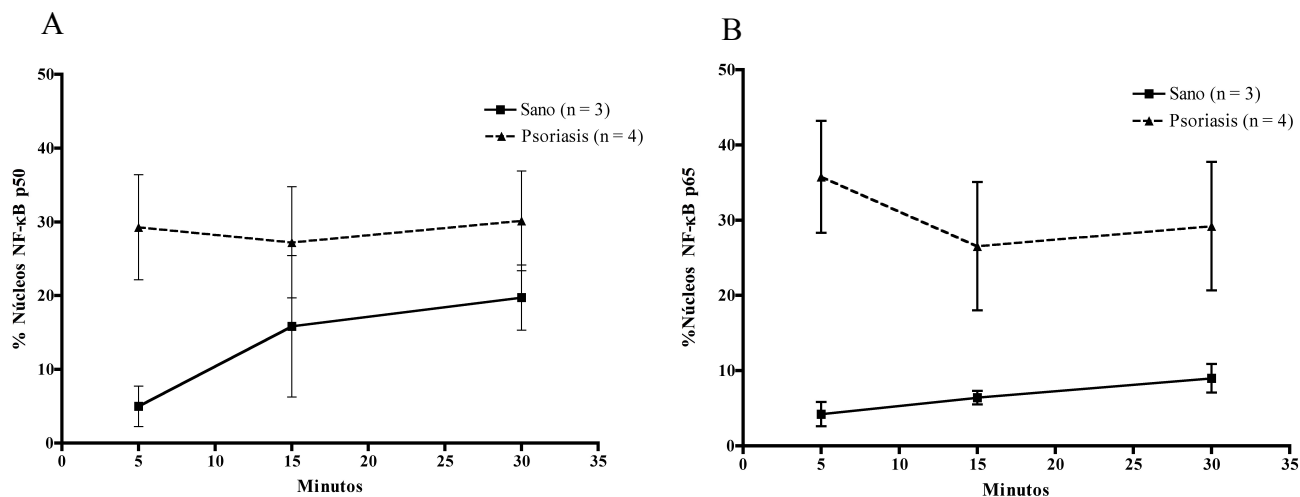


Figura 9. Cinética de activación de las subunidades p50 y p65 de NF- κ B en núcleos de CMSP de sujetos sanos y psoriásicos con LPS. Porcentaje de núcleos con NF- κ B p50 (A) y p65 (B) translocado, detectado por citometría de flujo proveniente de células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos y sujetos psoriásicos, activadas con LPS (1 μ g/ml) durante 5, 15 y 30 minutos. Las barras representan el error estándar.

III.5. Detección por citometría de flujo de NF- κ B activo en núcleos de CMSP incubadas con colágena por citometría de flujo

Una vez observado el comportamiento de activación de NF- κ B en las CMSP de sujetos psoriásicos por LPS, se procedió a verificar si la colágena tipo IV podía activar de alguna manera a las CMSP vía NF- κ B. Para lo cual se realizó una cinética de activación de NF- κ B para p50 (Figura 10A) y para p65 (Figura 10B) incubando CMSP de sujetos psoriásicos (n = 9) y sujetos sanos (n = 8) en en colágena tipo IV y sin estímulo. Las células de sujetos psoriásicos en comparación con los sanos, tienen un mayor porcentaje de translocación de ambas subunidades tanto en la condición sin estímulo como en la estimulación con colágena tipo IV, aunque el contacto de las células con colágeno tipo IV disminuye esta activación.

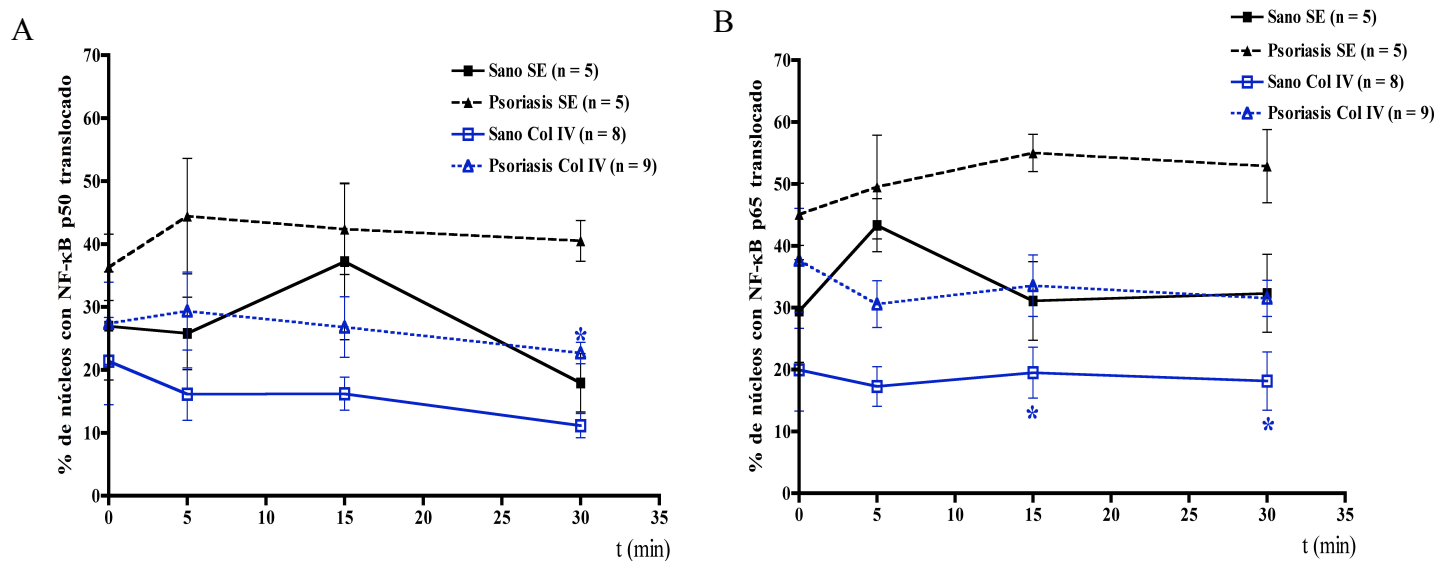


Figura 10. Cinética de activación de las subunidades p50 y p65 de NF- κ B en núcleos de CMSP de sujetos sanos y psoriásicos con o sin colágena tipo IV.

Se presenta el porcentaje de núcleos translocados con las subunidades p50 (A) y p65 (B) en núcleos de células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos y sujetos psoriásicos sin estimular o estimuladas con colágena tipo IV por 0, 5, 15 y 30 minutos. Se realizó la comparación de cada tiempo entre sujeto sano y psoriásico con una prueba de Wilcoxon $p \geq 0.05$.

III.6 Detección de NF- κ B activo en CMSP incubadas en colágena, por citometría de flujo

A continuación se evaluó el efecto de la incubación con colágena en un sujeto psoriásico y un sujeto sano, con el mismo esquema de estimulación y se evaluó con un anticuerpo anti NF- κ B fosfo p65 que discierne de la forma no activa de p65, por lo cual se puede evaluar intracelularmente, que brinda la ventaja de poder caracterizar el tipo de célula que se encuentra activada. Como se puede observar en la figura 11, los monocitos (CD14+) de sujetos psoriásicos se activan desde los 15 min al estar en contacto con colágena IV, a diferencia de los sujetos sanos (68.6% vs. 27.5%). Por último el porcentaje de células estimuladas en los sujetos psoriásicos disminuye a los 30 min mientras que en los sujetos sanos se incrementa (52.5% vs. 78.2%).

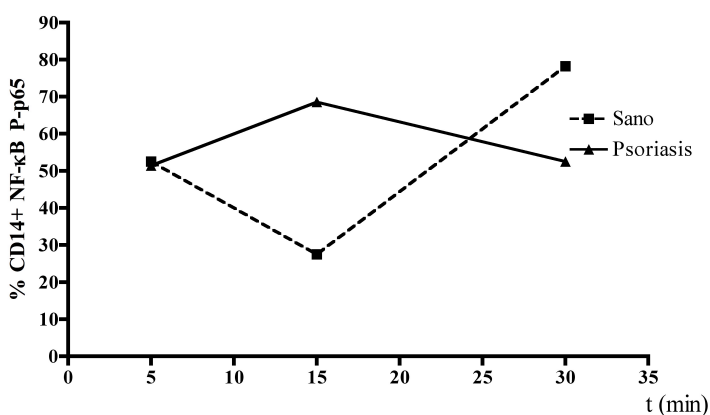


Figura 11. Porcentaje de NF- κ B fosfo p65 de monocitos (CD14+) de sujetos sanos y sujetos psoriásicos. Las CMSP se incubaron en colágena tipo IV durante 5, 15 y 30 minutos y se realizó la determinación por citometría de flujo.

III.7 Expresión diferencial de genes en CMSP de sujetos psoriásicos estimulados con colágena tipo IV y LPS por microarreglos de expresión

Se exploró la expresión diferencial de genes en CMSP provenientes de 3 sujetos sanos y 3 sujetos con psoriasis, en tres diferentes condiciones: CMSPs incubadas durante 12 horas en pozos sin recubrimiento(condición SE), CMSPs incubadas durante 12 horas en placas recubiertas con colágena IV(Col IV) y CMSPs estimuladas con LPS (1 μ g/ml) 4 horas más. El análisis de la expresión se llevó a cabo en el programa Affymetrix®Tiling

Analysis Software, cuyos resultados corresponden a un índice de expresión de los genes por las células de los sujetos psoriásicos, con respecto a la expresión de genes en las células provenientes de sujetos sanos. Se realizó una búsqueda entre los genes con relevancia estadística en sus diferencias de expresión y se eligieron genes que se han reportado con actividad pro o anti-inflamatoria.

Para las condiciones de incubación sin estímulo, se identificaron 1437 genes con diferencia estadística significativa de expresión, de los cuales únicamente se eligieron 37 genes que se encontraran relacionados con el proceso pro-inflamatorio y 7 con el proceso anti-inflamatorio. Para la estimulación con LPS, se encontraron 726 genes expresados diferencialmente, de los cuales se eligieron 22 genes relacionados con el proceso pro-inflamatorios y 6 con el anti-inflamatorio. Por último para las células incubadas en colágena, se encontraron 775 genes expresados diferencialmente y 27 en relación con el proceso pro-inflamatorio y 6 con el anti-inflamatorio (Figura 12).

De entre los genes anti-inflamatorios, se encontraron genes como el de IL-10 o para el receptor del factor de crecimiento transformante (TGF)- β TGFBR3, se expresan menos en las células psoriásicas sin estimular en ambos casos y estimuladas con colágena para el último ejemplo. Otro gen que llamó mucho la atención fue SIGIRR que se encuentra disminuido cuando las células no se estimulan y sobre expresado cuando las células son estimuladas con LPS.

Entre los genes de tipo pro-inflamatorio que se expresan diferencialmente, encontramos que cuando las células mononucleares no se estimulan, una gran variedad disminuyen su expresión como el receptor de quimiocinas CCR6, el receptor de IL-17 (IL-17R), una proteína accesoria del receptor de TNF (TNFAIP1) y dos de los receptores de la superfamilia del TNF (TNFSF14 y 15). Se encontraron algunos genes sobre expresados en esta condición como las quimiocinas CCL2 y CCL4L2, el factor regulador de interferón 5 (IRF5), las metaloproteinasas de matriz (MMP) 1 y 7, los TLRs 6 y 8 y un receptor de la superfamilia de TNF (TNFSF13B).

En el caso de las células estimuladas con LPS, se observa un gen anti-inflamatorio disminuye su expresión HMGB1, que es un ligando endógeno y la proteína de membrana SIGIRR se sobre expresa. A diferencia de esto, una gran variedad de genes proinflamatorios aumentan su expresión. Cabe destacar la proteína de membrana CD14, el receptor de formil péptidos FPR2, la cinasa asociada a muerte DAPK1, el antígeno leucocitario humano HLA-B, el receptor de IL-1 IL-1R1, la IL-23A, la IL-6, y varios genes

relacionados con la señalización por receptor de TNF como la proteína adaptadora TNFAIP2, y en gran medida el receptor TNFRSF21.

Por último, cuando las células se incuban con colágena tipo IV, se encontró que varios genes anti-inflamatorios aumentan su expresión como el factor inducible por hipoxia 1 HIF1A, el receptor tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos LAIR1 y el factor antiapoptótico de tiorredoxina TXNDC5. Entre los genes pro-inflamatorios que se expresaron al incubarse en colágena, podemos encontrar al factor inflamatorio de injertos AIF1, varias quimiocinas CCL2, CCL3L1 y CCL3L3, receptor CD38, el receptor CD93, el factor estimulante de colonias de granulocitos CSF3, que comparte con las células estimuladas con LPS, al igual que la DAPK1 y el FPR2, el IRF5 que comparte con las células no estimuladas y genes que comparte con la respuesta a TNF como TNFAIP2 y TNFSFR17.

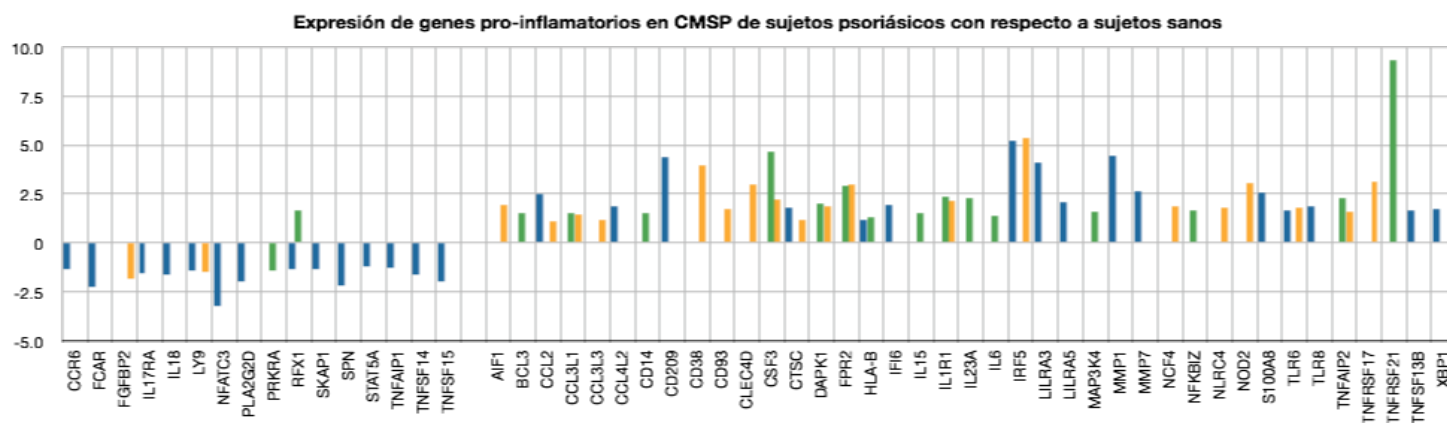
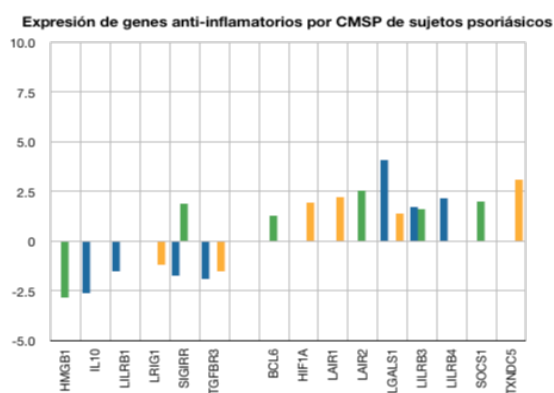


Figura 12. Genes proinflamatorios y anti-inflamatorios expresados diferencialmente en CMSP de sujetos psoriásicos. Se muestra en la gráfica los genes relacionados con el proceso inflamatorio que se encontró una expresión diferencia entre CMSP de sujetos psoriásicos con respecto a CMSP de sujetos sanos. Las CMSP fueron estimuladas en las diferentes condiciones experimentales: Sin estímulo SE ■, LPS ■ y Colágena tipo IV ■.

IV. Discusión

La capacidad de respuesta ante el estímulo LPS depende directamente de la capacidad de reconocimiento de esta molécula por parte de diversos receptores de superficie celular, entre los que se encuentran TLR4 y CD14(48). Se ha reportado que la sobreexpresión de estos receptores se relaciona directamente con una mayor capacidad de síntesis y secreción de citocinas proinflamatorias por células como neutrófilos y macrófagos en la psoriasis(13, 16). Para que esto ocurra se activan diferentes vías de señalización intracelular entre las que se encuentran la vías de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), las de señales de transducción activadoras de la transcripción (STATs) y NF- κ B. Esta última molécula, que una vez activa es capaz de reconocer a la región promotora del gen de TNF- α y con ello inducir su transcripción(49).

Se ha reportado que en sujetos con psoriasis los niveles de citocinas proinflamatorias se encuentran elevados, tanto a nivel sistémico(13) como localmente en la lesión afectada(6, 13), predominando una mayor detección de TNF- α en biopsias de piel afectada con psoriasis, en comparación con piel sana, aún de los mismos sujetos(16). También se detectan mayores niveles IFN- γ e IL-17 en extractos de piel afectada(13). IL-8, una quimiocina importante en el reclutamiento de neutrófilos hacia la lesión psoriásica y que además puede funcionar como un factor de crecimiento para los queratinocitos (lo cual vincula directamente a la inflamación local con el engrosamiento de la capa epidérmica) también se encuentra incrementado en piel lesionada de sujetos con psoriasis. Ahora bien, recientemente se encontró que el bloqueo de la subunidad α 1 de la integrina α 1 β 1, capaz de reconocer a colágena IV, colágena I así como laminina, disminuye los niveles del transcrito de IL-8 en un modelo de transferencia de piel con lesión psoriásica hacia ratón(19). Esta fue la primera evidencia que vincula a los componentes de matriz extracelular con las lesiones psoriásica. En trabajo previo de nuestro grupo, al exponer a células mononucleares (que potencialmente pueden infiltrar piel durante la generación y perpetuación del proceso inflamatorio local) de sujetos con psoriasis a colágena I y IV y después retarlas con LPS como estímulo proinflamatorio, estas células secretan mayores niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α que las células obtenidas de sujetos sin psoriasis(47). Así entonces para el presente trabajo decidimos explorar si este incremento en la respuesta al LPS se vincula con incrementos en la expresión y señalización de TLR4. Encontramos que efectivamente, al comparar los niveles de expresión en superficie de este receptor en

células CD14⁺⁺ (se sabe que éstas tienen mayor expresión de este receptor(50)) con sus propios niveles en condiciones basales (“sin estímulo”), en las células provenientes de sujetos con psoriasis, hay incremento de la expresión del receptor cuando se adiciona LPS únicamente y aún más si las células estuvieron previamente expuestas a colágena IV. Dado que se ha reportado que en los casos de artropatía psoriásica, estas células CD14⁺⁺ son la principal fuente de citocinas proinflamatorias(51), es factible que, a la vista de nuestros resultados, las células, al infiltrar hacia los tejidos y entrar en contacto con las colágenas del tejido, incrementen su capacidad de respuesta inflamatoria, aumentando la expresión de TLR4, por ejemplo, lo que, potencialmente, les conferiría mayor capacidad de secreción de citocinas proinflamatorias.

El que no encontráramos incrementos de TLR 2 en este mismo esquema de estimulación, nos sugiere que los componentes de matriz extracelular favorecen la respuesta proinflamatoria de las células de manera selectiva. Los procesos de remodelación de matriz extracelular de piel están alterados en psoriasis(7), ya que, micrografías electrónicas de placas psoriásicas muestran uniones interepidérmicas más laxas que las de piel no afectada además de mostrar una pérdida de la continuidad de la membrana basal de la unión dermo-epidérmica. Además, en psoriasis por la fragmentación de laminina(45, 52) y colágena tipo IV(45) esta incrementada. Dado que diferentes tipos de TLR, reconocen diferentes ligandos, es factible que en el caso de psoriasis, la remodelación y o señalización inducida por los componentes de matriz extracelular corresponda más a DAMPs reconocibles por TLR4 que por TLR2(39, 48). Esto es característico de procesos inflamatorios crónicos como artritis reumatoide, en el que se observa degradación de articulaciones e inclusive erosión ósea, que en condiciones normales no debería suceder, únicamente bajo procesos de remodelación de tejidos por daño o recambio, en donde las mismas células residentes de tejidos secretan MMP que la regulen la fragmentación de MEC y el reclutamiento de leucocitos con el objetivo de recuperar la homeostasis en el tejido(53).

Diversos estudios han explorado la relación entre los componentes de matriz extracelular y los TLR. En un modelo de artritis reumatoide en ratón, inducida por colágena y por bloqueo del receptor de IL-1 A (IL-1RA), se propone que ligandos de TLRs derivados de la degradación de la matriz extracelular de la sinovia participan activamente en el proceso inflamatorio y la inhibición de la señalización por TLR 4 con un antagonista alivia el proceso inflamatorio de la artritis, contribuyendo tanto a la disminución del

infiltrado celular, de mediadores proinflamatorios como IL-1 β y de la degradación de cartílago y erosión del hueso(54). De la misma manera en otro modelo m \acute{u} rido en el cual se induce artritis por col \acute{a} gena, utilizan LPS como agonista de TLR 4 para incrementar el proceso inflamatorio, por lo que dicen que la uni \acute{o} n de TLR 4 a uno de sus ligandos es necesario para la evoluci \acute{o} n del proceso inflamatorio, pero cuando se utilizan animales que cuentan con un TLR mutado, que carece de se \acute{n} alizaci \acute{o} n, el proceso inflamatorio no evoluciona(55). Por \acute{u} ltimo en un modelo m \acute{u} rido en de infarto al miocardio, se establece la relaci \acute{o} n entre la supervivencia de los ratones despu \acute{e} s del infarto y la remodelaci \acute{o} n del ventr \acute{i} culo izquierdo que induce una mayor activaci \acute{o} n de la se \acute{n} alizaci \acute{o} n por TLR 4 hacia MyD88 acompa \tilde{n} ada por un elevado infiltrado de linfocitos T CD3+ al tejido y una mayor proporci \acute{o} n de col \acute{a} gena. Al observar el mismo proceso en ratones Knock Out (KO) para TLR 4, se observa una mayor tasa de supervivencia, adjudicada a un proceso m \acute{i} nimo de remodelaci \acute{o} n del ventr \acute{i} culo izquierdo(53).

Estas evidencias apoyan la participaci \acute{o} n del TLR 4 en el proceso inflamatorio de la psoriasis. Se sabe que los queratinocitos psori \acute{a} sicos cuentan con una expresi \acute{o} n aumentada del TLR 2(56) y que su estimulaci \acute{o} n puede incrementar el proceso inflamatorio por la liberaci \acute{o} n de quimiocinas y citocinas proinflamatorias, pero hasta el momento, este es el primer reporte en el que se establece la relaci \acute{o} n entre el la regulaci \acute{o} n que puede tener la col \acute{a} gena en la expresi \acute{o} n de TLR 4, que al parecer en monocitos sanos disminuye la expresi \acute{o} n pues es un mecanismo conocido de regulaci \acute{o} n ante ligandos de TLR 4 como LPS(50) y en el proceso psori \acute{a} sico esta regulaci \acute{o} n podr \acute{i} a no llevarse a cabo incrementando su expresi \acute{o} n al reconocer alguno de sus ligandos como LPS o como se propondr \acute{i} a en este trabajo, un p \acute{e} ptido derivado de la degradaci \acute{o} n de la col \acute{a} gena. Se conoce que ambos TLRs se expresan a las 4 h de inducci \acute{o} n con LPS⁵⁰, y el hecho de haber encontrado que la expresi \acute{o} n de TLR 4 permanece durante 12 h cuando las c \acute{e} lulas se incuban con col \acute{a} gena y no se incrementa significativamente al a \tilde{n} adir LPS, implicar \acute{i} a que la inducci \acute{o} n de la expresi \acute{o} n es debida al contacto con la col \acute{a} gena y los p \acute{e} ptidos derivados de su degradaci \acute{o} n, hecho que se comprueba al utilizar el GM6001, en donde la expresi \acute{o} n del TLR 4 se observa claramente abatida.

La evidencia m \acute{a} s directa de la inducci \acute{o} n del proceso inflamatorio derivado del contacto con col \acute{a} gena, viene de un estudio de osteoporosis, en el cual se encontr \acute{o} que mujeres con alta resorci \acute{o} n \acute{o} sea ten \acute{i} an incrementada la IL-1 en circulaci \acute{o} n y que se ha encontrado monocitos adheridos a fragmentos de hueso. Tomando este fen \acute{o} meno como

antecedente, los autores estimulan células mononucleares de sangre periférica humanas con componentes óseos y con colágena tipo I, encontrando un incremento en la producción de IL-1 principalmente al incubarse con colágena por 48 h y que se incrementa al encontrarse degradada por colagenasa de ovario, y que el efecto de la producción se ve abatido al utilizar un anticuerpo para bloquear la integrina $\alpha 2\beta 1$ que reconoce específicamente colágena tipo I(57). Posteriormente en otro artículo encuentran que una vez que las células mononucleares han estado en contacto con colágena, y han producido IL-1, si entran en contacto con otro componente de matriz como fibronectina, elevan aún más la producción de IL-1. Ellos mencionan que durante los procesos inflamatorios, para la resolución de los mismos, las células mononucleares liberan fibronectina en el medio, que potenciaría su respuesta inflamatoria y que esta respuesta está mediada por el contacto de las integrina $\alpha 2\beta 1$ con la colágena y la integrina $\alpha 1\beta 5$ con la fibronectina(58). Esto concuerda con las observaciones previas en donde observamos que el contacto de CMSP con colágena incrementa la síntesis de IL-1 β . El primer reconocimiento de colágena es mediado por la integrina $\alpha 2\beta 1$ para colágena tipo I, y por $\alpha 1\beta 1$ para colágena tipo I y tipo IV y se sabe que su inhibición alivia el procesos inflamatorios como artritis inducida en ratones e hipersensibilidad por la inhibición de la migración de los leucocitos al sitio de inflamación (31). Pero las integrinas también tienen la capacidad de inducir señalización al reconocimiento de sus ligandos y favorecer la síntesis de mediadores que pueden estar relacionados con la capacidad migratoria de las células como metaloproteinasas de matriz (MMP) 9 como en monocitos humanos, que al estar expuestos a colágena tipo I incrementan su expresión mediada por NF- κ B(32).

En cuanto a la activación de NF- κ B, hemos confirmado la observación en un primer acercamiento de estandarización, que al estimular las CMSP con LPS (1 μ g/ml), la cinética de translocación al núcleo se mantiene constante para los sujetos sanos al activarse claramente a los 30 minutos(59), pero en comparación, los psoriásicos presentan una cinética más temprana comenzando desde los 5 min, (50% menos tiempo que en sujetos sanos). Esto confirmaría la posibilidad de que las CMSP de sujetos psoriásicos pueden generar un ambiente proinflamatorio con mayor facilidad ante el contacto con cualquier estímulo. Esto se ha asociado con que los pacientes psoriásicos deben de monitorearse con mayor cuidado pues inclusive pueden presentar eventos cardiovasculares con mayor facilidad debido a esta capacidad de generar inflamación(60).

La activación tanto de la subunidad p65 como de p50 de NF- κ B en los sujetos con psoriasis se presenta en mayor intensidad inclusive cuando las CMSP se encuentran sin estímulo, y es un incremento significativamente mayor que en las CMSP de sujetos sanos, que además parece persistir a través del tiempo, lo que posiblemente indicaría que las células de sujetos psoriásicos que circulan en el torrente sanguíneo se mantienen activadas en todo momento. En diversos trabajos se ha encontrado una mayor actividad de NF- κ B p65 tanto en queratinocitos como en linfocitos T(61) de piel psoriásica y macrófagos de sinovas de sujetos con artritis psoriásica(62), y cuando se emplean inhibidores tanto de la señalización de NF- κ B, como de la actividad de degradación del proteosoma, la producción de citocinas disminuye y con ello el proceso inflamatorio.

Ahora bien cuando estas mismas células se ponen en contacto con colágena tipo IV, se observa una significativa disminución en la actividad de ambas subunidades en los primeros 30 minutos, tanto en CMSP de sujetos sanos como de sujetos psoriásicos, lo que estaría haciendo relación con que el primer contacto de la célula con la colágena, disminuye la activación que podría haberse generado durante el proceso de separación de las células o probablemente el proceso de activación propia de las células psoriásicas. Este hecho parecería que en las CMSP de sujetos sanos inhibiría cualquier activación previa de la célula al entrar al tejido y reconocer colágena, como un mecanismo regulador para evitar la activación exacerbada de la célula, pero al parecer en las CMSP de psoriasis, esta regulación no es suficiente para regular su capacidad inflamatoria, pues aunque se vea disminuido el porcentaje de núcleos con p65 y p50 en aproximadamente un 40% de su activación sin estimular, esta presencia podría continuar induciendo la rápida transcripción de genes proinflamatorios como citocinas proinflamatorias, MMPs y receptores como TLRs.

Esto nos podría sugerir que la colágena presenta un mecanismo regulador en tiempos tempranos, pero si el contacto de la célula persiste, como se ha sugerido que las células mononucleares en contacto con colágena tipo I por 24 horas podrían activarse vía NF- κ B para comenzar a producir MMP-9 que degradarían la colágena(32), lo cual podría a su vez generar fragmentos que activarían a las células para producir mediadores proinflamatorios como IL-1 β (57). Respecto a la activación de MMPs, interesantemente evidenciamos en nuestro trabajo que, al estimular CMSP de sujetos con psoriasis y de sanos con colágena tipo IV y tipo I por 12 h, estas secretan más MMP-9 activa que las células de sujetos sin psoriasis, Esto podría conferirle a las células dos cualidades

fundamentales en el mantenimiento de procesos inflamatorios locales. Por un lado, mayor actividad de MMPs les podría conferir mayor capacidad de remodelación de MEC y por lo tanto facilitar la migración o infiltración hacia los tejidos, como , en esta caso, la piel. Por otro lado y sin ser excluyente con el proceso anterior, la exacerbada liberación de formas activas de las MMPs podría generar mayor cantidad de DAMPs derivados de la degradación de la MEC, lo cual podría relacionarse con una mayor activación por parte de las células proinflamatorias, tanto residentes como infiltrantes a piel, lo cual coincidiría con reportes previos en los que aumenta la capacidad de las células para favorecer el proceso inflamatorio mediante la degradación de la colágena que estimularía a las propias células para producir citocinas proinflamatorias como IL-1 β (57), de hecho también es sabido que las mismas MMPs tienen capacidad de activar citocinas secretadas en forma de zimógenos, la MMP-9 en particular tiene la capacidad de llevar la pro-IL-1 β a su forma activa⁶⁶. Si a la generación de mayor cantidad de DAMPs sumamos un incremento en la expresión de PRRs capaces de reconocerlos (entre los que se podría encontrar en TLR4 sobreexpresado de nuestros resultados), esto nos podría dar como resultado una mayor capacidad de secreción de citocinas proinflamatorias como habíamos observado previamente al analizar CMSPs de sujetos psoriásicos en contacto con colágena(47).

Finalmente, la identificación de la expresión de nuevos genes relacionados con la respuesta proinflamatoria en células que entran en contacto con colágena, genes que están relacionados con una mayor posibilidad de generar una respuesta inflamatoria como pueden ser las quimiocinas CCL, para el reclutamiento de más células al sitio de inflamación, el receptor de IL-1, que como se comentó previamente esta citocina tiene una marcada importancia en células que interactuaron con colágena, receptores como el FPR 2 (receptor de formil péptidos) y TLR 6, que potencialmente pudieran reconocer los fragmentos derivados de la degradación de la matriz. Una de los genes que llamó aún más la atención fue la disminución del gen SIGIRR ante la estimulación con colágena tipo IV. SIGIRR es una proteína transmembranal que forma parte de la superfamilia Toll Like Receptors – Receptor de Interleucina-1 (TLR-IL-1R). A diferencia, SIGIRR no activa NF- κ B al entrar en contacto con IL-1(63). Se ha demostrado que esta proteína de membrana puede inhibir la señalización de IL-1R en presencia de IL-1 hacia NF- κ B(64). Además de tener la capacidad de inhibir la activación de NF- κ B vía IL-1R puede también inhibir la señalización de IL-18R, el cual también es parte de la familia de los receptores tipo IL-1R. Cuando la célula carece de SIGIRR, la estimulación con IL-1 o un ligando de TLRs (LPS y

CpG) lleva a un incremento en la síntesis de quimiocinas y proteína C reactiva, debido a que SIGIRR interactúa mediante su dominio TIR con TLR4, lo cual en nuestro trabajo apoya la sobreexpresión de este TLR y el incremento en la capacidad de señalización del mismo hacia NF- κ B además de que el receptor de IL-1 β lo encontramos incrementado, por lo que al menos por parte de la capacidad reguladora de SIGIRR ante la señalización por TLR y IL-1R se encuentra comprometida. Esta expresión diferencial ante el contacto con colágena abre, sobre todo, nuevas líneas de investigación en las que se podrían, no solo esclarecer los mecanismos fisiopatogénicos de la psoriasis incluyendo a los componentes de la MEC como potenciadores y/o perpetuadores de la respuesta inflamatoria, sino que también pueden representar futuros blancos terapéuticos en el manejo de esta difícil enfermedad, capaz de disminuir la calidad de vida de los pacientes aún más que a diabetes mellitus.

V. Conclusiones

Se encontró una mayor expresión de TLR 4 en las células CD14 + de sujetos psoriásicos principalmente ante la estimulación con colágena tipo IV y colágena tipo IV con posterior estimulación de LPS, lo que en las células de sujetos sanos disminuye la expresión del mismo. La expresión de TLR 2 no se observó significativamente modificada por la exposición a los estímulos en sujetos psoriásicos y al parecer en sujetos sanos la colágena tipo I puede disminuir ligeramente la expresión del mismo.

La capacidad de señalización del TLR 4 en las células mononucleares psoriásicas se observa incrementada al estimular con LPS activando las subunidades p50 y p65 de NF- κ B desde los 5 minutos. Se observa una actividad contraria cuando las células se incuban con colágena tipo IV disminuyendo la actividad de ambas subunidades a los 30 min de exposición tanto en células de sujetos psoriásicos como en células de sujetos sanos aunque disminuye aún más en estas últimas.

La actividad de la MMP-9 se encuentra incrementada en células mononucleares de sujetos psoriásicos expuestas a colágena tipo IV y aún más a colágena tipo I en comparación con las células de sujetos sanos. Esta actividad es inhibida por GM6001 que además parece disminuir también la expresión de TLR 4 inducida por el contacto con colágena tipo IV.

Las células mononucleares de sujetos psoriásicos presentan un perfil de expresión de genes proinflamatorios en comparación con células de sujetos sanos, con además una disminución de algunos genes que codifican para proteínas que intervienen en el proceso regulador de la inflamación.

La colágena tipo IV puede modificar la capacidad proinflamatoria de células mononucleares de sujetos psoriásicos al incrementar sus capacidades de reconocimiento y respuesta ante estímulos de daño generados por una cronicidad del proceso, que además es apoyado por un incremento en los genes que favorecen el proceso inflamatorio, sin una aparente capacidad de regulación del proceso.

VI. Referencias

1. Lebwohl, M. 2003. Psoriasis. *Lancet* 361:1197-1204.
2. Bos, J.D. 2005. Skin Immune System: Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology. CRC Press,
3. Nestle, F.O., D.H. Kaplan, and J. Barker. 2009. Psoriasis. *N Engl J Med* 361:496-509.
4. Bowcock, A.M., and J.G. Krueger. 2005. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat.Rev.Immunol.* 5:699-711.
5. Griffiths, C.E., and J.N. Barker. 2007. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 370:263-271.
6. Bos, J.D., M.A. de Rie, M.B. Teunissen, and G. Piskin. 2005. Psoriasis: dysregulation of innate immunity. *Br.J.Dermatol.* 152:1098-1107.
7. Lowes, M.A., A.M. Bowcock, and J.G. Krueger. 2007. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445:866-873.
8. Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-435.
9. Bachelez, H. 2005. Immunopathogenesis of psoriasis: recent insights on the role of adaptive and innate immunity. *J.Autoimmun.* 25 Suppl:69-73.
10. Chang, J.C., L.R. Smith, K.J. Froning, B.J. Schwabe, J.A. Laxer, L.L. Caralli, H.H. Kurland, M.A. Karasek, D.I. Wilkinson, and D.J. Carlo. 1994. CD8+ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V beta 3 and/or V beta 13.1 genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:9282-9286.
11. Rose, D.M., R. Alon, and M.H. Ginsberg. 2007. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol.Rev.* 218:126-134.
12. Buske-Kirschbaum, A., S. Kern, M. Ebrecht, and D.H. Hellhammer. 2007. Altered distribution of leukocyte subsets and cytokine production in response to acute psychosocial stress in patients with psoriasis vulgaris. *Brain Behav.Immun.* 21:92-99.

13. Pietrzak, A.T., A. Zalewska, G. Chodorowska, D. Krasowska, A. Michalak-Stoma, P. Nockowski, P. Osemlak, T. Paszkowski, and J.M. Rolinski. 2008. Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin Chim Acta* 394:7-21.
14. Banno, T., A. Gazel, and M. Blumenberg. 2004. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J.Biol.Chem.* 279:32633-32642.
15. Gaspari, A.A. 2006. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J.Am.Acad.Dermatol.* 54:S67-S80.
16. Gottlieb, A.B., F. Chamian, S. Masud, I. Cardinale, M.V. Abello, M.A. Lowes, F. Chen, M. Magliocco, and J.G. Krueger. 2005. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J.Immunol.* 175:2721-2729.
17. Ghoreschi, K., C. Weigert, and M. Rocken. 2007. Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. *Clin.Dermatol.* 25:574-580.
18. Agace, W.W. 2006. Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat.Rev.Immunol.* 6:682-692.
19. Conrad, C., O. Boyman, G. Tonel, A. Tun-Kyi, U. Laggner, F.A. de, V. Kotelianski, H. Gardner, and F.O. Nestle. 2007. Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nat.Med.* 13:836-842.
20. Gumbiner, B.M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357.
21. Yonekawa, K., and J.M. Harlan. 2005. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J.Leukoc.Biol.* 77:129-140.
22. Streuli, C. 1999. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:634-640.
23. Sturm, A., K.A. Krivacic, C. Fiocchi, and A.D. Levine. 2004. Dual function of the extracellular matrix: stimulatory for cell cycle progression of naive T cells and antiapoptotic for tissue-derived memory T cells. *J.Immunol.* 173:3889-3900.

24. Friedl, P. 2004. Dynamic imaging of cellular interactions with extracellular matrix. *Histochem. Cell Biol.* 122:183-190.
25. Tanzer, M.L. 2006. Current concepts of extracellular matrix. *J. Orthop. Sci.* 11:326-331.
26. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002. *Molecular Biology of The Cell.* Garland Science,
27. Bosman, F.T., and I. Stamenkovic. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* 200:423-428.
28. Fitzpatrick, T.B. 2006. *Dermatolog^oa en Medicina General.* Panamericana,
29. Wang, T.W., J.S. Sun, Y.C. Huang, H.C. Wu, L.T. Chen, and F.H. Lin. 2006. Skin basement membrane and extracellular matrix proteins characterization and quantification by real time RT-PCR. *Biomaterials* 27:5059-5068.
30. Khoshnoodi, J., K. Sigmundsson, J.P. Cartailier, O. Bondar, M. Sundaramoorthy, and B.G. Hudson. 2006. Mechanism of chain selection in the assembly of collagen IV: a prominent role for the alpha2 chain. *J. Biol. Chem.* 281:6058-6069.
31. de Fougerolles, A.R., A.G. Sprague, C.L. Nickerson-Nutter, G. Chi-Rosso, P.D. Rennert, H. Gardner, P.J. Gotwals, R.R. Lobb, and V.E. Kotliansky. 2000. Regulation of inflammation by collagen-binding integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 in models of hypersensitivity and arthritis. *J Clin Invest* 105:721-729.
32. Poitevin, S., R. Garnotel, F. Antonicelli, P. Gillery, and P. Nguyen. 2008. Type I collagen induces tissue factor expression and matrix metalloproteinase 9 production in human primary monocytes through a redox-sensitive pathway. *J Thromb Haemost* 6:1586-1594.
33. Morwood, S.R., and L.B. Nicholson. 2006. Modulation of the immune response by extracellular matrix proteins. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 54:367-374.
34. Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
35. Kawai, T., and S. Akira. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816-825.

36. Kawai, T., and S. Akira. 2007. TLR signaling. *Semin Immunol* 19:24-32.
37. Barton, G.M. 2007. Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin Immunol* 19:33-40.
38. Miyake, K. 2007. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol* 19:3-10.
39. Beutler, B. 2007. Neo-ligands for innate immune receptors and the etiology of sterile inflammatory disease. *Immunol Rev* 220:113-128.
40. Wang, J.H., B.J. Manning, Q.D. Wu, S. Blankson, D. Bouchier-Hayes, and H.P. Redmond. 2003. Endotoxin/lipopolysaccharide activates NF-kappa B and enhances tumor cell adhesion and invasion through a beta 1 integrin-dependent mechanism. *J Immunol* 170:795-804.
41. Nijhuis, M.M., G. Pasterkamp, N.I. Sluis, D.P. de Kleijn, J.D. Laman, and L.H. Ulfman. 2007. Peptidoglycan increases firm adhesion of monocytes under flow conditions and primes monocyte chemotaxis. *J Vasc Res* 44:214-222.
42. Matzinger, P. 2007. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol* 8:11-13.
43. Jiang, D., and P.W. Noble. 2006. Matrix Regulation of Lung Injury, Inflammation and Repair The Role of the Innate Immunity. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 3:401-404.
44. Li, Y.Y., and H.T. Cheung. 1992. Basement membrane and its components on lymphocyte adhesion, migration, and proliferation. *J.Immunol.* 149:3174-3181.
45. Fleischmajer, R., K. Kuroda, R. Hazan, R.E. Gordon, M.G. Lebowitz, A.N. Sapadin, F. Unda, N. Iehara, and Y. Yamada. 2000. Basement membrane alterations in psoriasis are accompanied by epidermal overexpression of MMP-2 and its inhibitor TIMP-2. *J Invest Dermatol* 115:771-777.
46. Vogel, W.F. 2001. Collagen-receptor signaling in health and disease. *Eur J Dermatol* 11:506-514.

47. Sánchez-López, J.A. 2008. Respuesta de células mononucleares de sangre periférica de sujetos psoriásicos y no psoriásicos expuestas a proteínas de matriz extracelular. In Universidad La Salle.
48. Miyake, K. 2004. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Semin Immunol* 16:11-16.
49. Chen, L.F., and W.C. Greene. 2004. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:392-401.
50. Hadley, J.S., J.E. Wang, S.J. Foster, C. Thiemermann, and C.J. Hinds. 2005. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. *Infect Immun* 73:7613-7619.
51. Nishibu, A., G.W. Han, K. Iwatsuki, T. Matsui, M. Inoue, H. Akiba, R. Kaneko, and F. Kaneko. 1999. Overexpression of monocyte-derived cytokines in active psoriasis: a relation to coexistent arthropathy. *J Dermatol Sci* 21:63-70.
52. Jean, J., M. Lapointe, J. Soucy, and R. Pouliot. 2009. Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *J Dermatol Sci* 53:19-25.
53. Riad, A., S. Jager, M. Sobirey, F. Escher, A. Yaulema-Riss, D. Westermann, A. Karatas, M.M. Heimesaat, S. Bereswill, D. Dragun, M. Pauschinger, H.P. Schultheiss, and C. Tschöpe. 2008. Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *J Immunol* 180:6954-6961.
54. Abdollahi-Roodsaz, S., L.A. Joosten, M.F. Roelofs, T.R. Radstake, G. Matera, C. Popa, J.W. van der Meer, M.G. Netea, and W.B. van den Berg. 2007. Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis Rheum* 56:2957-2967.
55. Lee, E.K., S.M. Kang, D.J. Paik, J.M. Kim, and J. Youn. 2005. Essential roles of Toll-like receptor-4 signaling in arthritis induced by type II collagen antibody and LPS. *Int Immunol* 17:325-333.

56. Musette, P., I. Auquit Auckbur, and E. Begon. 2006. [Innate immunity: cutaneous expression of Toll-like receptors]. *Med Sci (Paris)* 22:149-152.
57. Pacifici, R., A. Carano, S.A. Santoro, L. Rifas, J.J. Jeffrey, J.D. Malone, R. McCracken, and L.V. Avioli. 1991. Bone matrix constituents stimulate interleukin-1 release from human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 87:221-228.
58. Pacifici, R., C. Basilico, J. Roman, M.M. Zutter, S.A. Santoro, and R. McCracken. 1992. Collagen-induced release of interleukin 1 from human blood mononuclear cells. Potentiation by fibronectin binding to the alpha 5 beta 1 integrin. *J Clin Invest* 89:61-67.
59. Sharif, O., V.N. Bolshakov, S. Raines, P. Newham, and N.D. Perkins. 2007. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol* 8:1.
60. Lowes, M.A., A.M. Bowcock, and J.G. Krueger. 2007. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445:866-873.
61. Amigo, M., M. Paya, S. De Rosa, and M.C. Terencio. 2007. Antipsoriatic effects of avarol-3'-thiosalicylate are mediated by inhibition of TNF-alpha generation and NF-kappaB activation in mouse skin. *Br J Pharmacol* 152:353-365.
62. Danning, C.L., G.G. Illei, C. Hitchon, M.R. Greer, D.T. Boumpas, and I.B. McInnes. 2000. Macrophage-derived cytokine and nuclear factor kappaB p65 expression in synovial membrane and skin of patients with psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 43:1244-1256.
63. E Thomassen, B R Renshaw, J E Sims, 1999. Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily; *Cytokine*; vol. 11 (6) pp. 389-99
64. N Polentarutti, G Penton Rol, M Muzio, D Bosisio, M Camnasio, F Riva, C Zoja, A Benigni, S Tomasoni, A Vecchi, C Garlanda, A Mantovani; 2003. Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR; *Eur Cytokine Netw*; vol. 14 (4) pp. 211-8

