



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E  
INMUNOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**LINFOCITOS T PRODUCTORES DE IL-17 EN PATOLOGÍAS  
AUTOINMUNES HUMANAS.**

*SILVIA FERNÁNDEZ ÁLVAREZ.*

*Córdoba, 2011*

TITULO: *Linfocitos T productores de IL-17 en patologías autoinmunes humanas*

AUTOR: *Silvia Fernández Álvarez*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2011  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---

ISBN-13: 978-84-694-4773-4





**MANUEL SANTAMARÍA OSSORIO, Catedrático de Inmunología del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba.**

**CERTIFICA:**

La tesis doctoral titulada **“LINFOCITOS T PRODUCTORES DE IL-17 EN PATOLOGÍAS AUTOINMUNES HUMANAS”** ha sido realizada bajo mi dirección por Dña. **SILVIA FERNÁNDEZ ÁLVAREZ**, Licenciada en Ciencias Biológicas y Máster en Metodología de la Investigación en Ciencias de la Salud, y que reúne a mi juicio condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de DOCTOR.

Y para que conste, firmo el presente informe en:

Córdoba, España, a 31 de Enero de 2011

Fdo.: Dr. Manuel Santamaría Ossorio





**DRA. D<sup>a</sup>. CONSUELO ORTEGA GROMAZ, Doctora en Medicina y Cirugía (P.I.) de la Universidad de Córdoba.**

**CERTIFICA:**

La tesis doctoral titulada **“LINFOCITOS T PRODUCTORES DE IL-17 EN PATOLOGÍAS AUTOINMUNES HUMANAS”** ha sido realizada bajo mi dirección por Dña. **SILVIA FERNÁNDEZ ÁLVAREZ**, Licenciada en Ciencias Biológicas y Máster en Metodología de la Investigación en Ciencias de la Salud, y que reúne a mi juicio condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de DOCTOR. .

Y para que conste, firmo el presente informe en:

Córdoba, España, a 31 de Enero de 2011

Fdo.: Dra. Consuelo Ortega Gromaz





**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E**  
**INMUNOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**  
**LINFOCITOS T PRODUCTORES DE IL-17 EN PATOLOGÍAS**  
**AUTOINMUNES HUMANAS.**

Silvia Fernández Álvarez

Memoria presentada para optar al título de Doctora por la Universidad de Córdoba. Este trabajo se ha realizado bajo la supervisión del Dr. Manuel Santamaría Ossorio y de la Dra. Consuelo Ortega Gromaz en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Fdo.: Silvia Fernández Álvarez

Córdoba 31 de Enero de 2011



## AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las personas que han compartido conmigo estos años de trabajo, a aquellos que me han acompañado en este apasionante viaje y que han hecho posible que este sueño se convierta en realidad.

En primer lugar a mis directores de Tesis, al Dr. Manuel Santamaría Ossorio y a la Dra. Consuelo Ortega Gromaz. Gracias por haber puesto a mi disposición todo lo necesario para realizar este trabajo. Gracias por haber confiado en mí, aún cuando ni yo misma lo hacía. Gracias por no cesar en el empeño de hacer de mí mucho más que una científica. Gracias por haber sido mucho más que unos jefes.

Gracias a mis compañeros de Rabanales y del Hospital Provincial. Gracias a Juan Antonio, por hacerme reír y darme ánimos para seguir todos los días. A Laura, Mario, Carmen Campos, Alejandra, Rocío, Natalia, Pilar Aguilar, Marisa, Orlando y por supuesto a Inma, por hacerme ver que todo llega, aunque el camino sea largo y pedregoso. Gracias por todos los buenos momentos, que espero que sigamos pasando, no hubiera sido tan divertido sin vosotros.

Gracias a mis amigos, y espero no olvidarme de ninguno: Mari, Paco, Mimi, Tina, Curro, M<sup>a</sup> Loli, Ángel, Susana, Carmen Herencia, Tony, Auxi y Javi; por aguantar mis “manías” y “sacarme a la calle” cuando lo necesitaba. Y por supuesto a Rocío, porque además de todo eso, me ha puesto la Tesis bonita.

Gracias a mis suegros Antonio y Ángela, a la abuela Isabel y por supuesto al abuelo Antonio (presente siempre). A Ángel y Yolanda y a mis sobrinos Ángel Jr. y Carlos (la sonrisa garantizada). Gracias a todos por ayudarme en los momentos difíciles y compartir mis alegrías.

Gracias a mi familia, Sandra, Rita y Rafa, Asunción y Manolo, M<sup>a</sup> Carmen, Pepe y Aurora, por compartir mi vida y llenarla de momentos especiales.

Gracias a mis Padres Teresa y Antonio, a mi hermano Moisés, a Alicia y a mi sobrina Clara (mi campeona de las pequeñas), las mejores personas del mundo, los que me han convertido en lo que soy. Gracias a mis padres y a mi hermano por no dejar que me derrumbe ni un instante a lo largo de 30 años. Por quererme y apoyarme en todo. Sin vosotros, simplemente no lo hubiera podido hacer.

Y por último y no por ello menos importante a Antonio. Gracias por quererme cada día, por aguantarme cada día, por recorrer este camino cogido de mi mano y con una sonrisa en los labios. Esta Tesis es tuya más que de nadie.

Gracias a todos.

## **A mis Padres**

Nada espero, nada sé,  
nada tengo, solo fe.  
Y donde estemos, saber estar;  
aunque sea ingenuo, no codiciar.  
Nunca ceder ante la adversidad.  
Quiero tener  
la alegría del que está en paz.

M. García.



# Índice



	Páginas
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
Pacientes, controles y obtención de muestras.....	53
Reactivos.....	54
Estudio de histocompatibilidad.....	59
Aislamiento y expansión de células T.....	60
Citometría de flujo.....	62
Cuantificación de IL17A, IL-21, IL-22, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ y TGF $\beta$ .....	63
Estudios funcionales.....	63
Polarización de células T CD8 <sup>+</sup> psoriásicas.....	65
Estudio de citotoxicidad en psoriasis.....	65
Microscopía confocal.....	66
PCR a tiempo real (qPCR).....	66
Análisis estadístico.....	67
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
Aislamiento de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> .....	73
Expresión de citoquinas en linfocitos T CD8 <sup>+</sup> .....	74
Fenotipo de células T CD8 <sup>+</sup> /IL-17A <sup>+</sup> .....	77
Regulación transcripcional de células T CD8 <sup>+</sup> /IL-17A <sup>+</sup> derivadas de placas psoriásicas.....	83
Estudio funcional de células T CD8 <sup>+</sup> /IL-17A <sup>+</sup> .....	86
Aislamiento de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	95
Regulación transcripcional de células T CD4 <sup>+</sup> /IL-17A <sup>+</sup> .....	104
Actividad funcional del TGF $\beta$ .....	106

	Páginas
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>127</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>155</b>
ANEXO I: (Índice de Figuras).....	157
ANEXO II: (Índice de Abreviaturas).....	163
ANEXO III: (Publicaciones).....	167

# **Introducción**



Los linfocitos T se han subdividido clásicamente en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Mientras los últimos son responsables de la destrucción de células infectadas por agentes infecciosos intracelulares y células que presentan anomalías de algún tipo en su membrana, como la expresión de determinados receptores o la ausencia de expresión de otros, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> desarrollan funciones diversas de control y regulación de los demás elementos del sistema inmune, dirigiendo así la respuesta adquirida frente a los antígenos por cada uno de esos elementos. Las células T CD4<sup>+</sup> no representan, en términos funcionales una población homogénea y única. Antes al contrario, ya en la década de los 80 del pasado siglo pudo observarse que si bien no difieren en aspectos morfológicos, existían al menos dos subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> que se distinguen por su capacidad para la producción de diferentes citoquinas. En efecto, en 1986 se demuestra por primera vez, empleando clones de células T CD4<sup>+</sup> de ratón, que su estimulación “in vitro” con antígeno resultaba en la producción de diferentes citoquinas. Dos patrones diferentes de producción de citoquinas fueron descritos, añadiéndose la observación de que dicha producción es mutuamente excluyente, esto es, las producidas por uno de los grupos no es producida por el otro y viceversa. Se denominaron en consecuencia linfocitos Th1, cuyo patrón de producción de citoquinas es IFN $\gamma$  e IL-2, y Th2 que producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, entre otras. Hoy conocemos esta división de subtipos de células T CD4<sup>+</sup> como el “Paradigma Th1/Th2” [1].

El Paradigma Th1/Th2, presenta las propiedades funcionales, distintas, que el patrón de citoquinas confiere a cada subtipo celular permitiendo una mejor comprensión de los mecanismos implicados en la protección del individuo frente a infecciones así como en la patogénesis de diversas enfermedades. La secreción diferencial de citoquinas en cada uno de los subtipos celulares es la idea fundamental que sustenta este modelo. El Paradigma Th1/Th2 asimismo evidenció la importancia de los procesos y elementos celulares y moleculares responsables de su diferenciación desde linfocitos CD4<sup>+</sup> vírgenes o naive (Th) [1].

Así en presencia de IL-12 las células T CD4<sup>+</sup> naive se diferencian a células Th1, en un proceso donde STAT-4 y T-bet son los factores de transcripción responsables. Por otro lado, la IL-4 promueve el desarrollo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes hacia células Th2 mediante la activación de los factores de transcripción STAT6 y GATA3 [1-4]

El modelo de células Th1 y Th2 como únicos subgrupos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se ha mantenido vigente durante 20 años hasta el descubrimiento de una tercera subpoblación de células T CD4<sup>+</sup> efectoras a la que se ha designado como Th17 por su capacidad de producir y secretar IL-17A [5, 6].

La subpoblación celular Th17 se origina a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes en presencia de IL-6 y TGFβ (Transforming growth factor beta) que mediante la activación de STAT3, los receptores nucleares de ácido retinoico RORγt y RORα y el factor 4 regulador del interferón IRF4 (Interferon-regulatory factor 4) [7-11] como factores de transcripción esenciales dan lugar a la síntesis y liberación de IL-17A

Las células Th17 producen también otras citoquinas como IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21 e IL-22 además de otros factores solubles, entre los que se encuentran algunas quimioquinas [12, 13]. Las quimioquinas son un grupo de proteínas que estimulan el movimiento de leucocitos y regulan su migración. Su principal acción biológica es la atracción de células hacia la zona de infección, regulando el tráfico de linfocitos y otros leucocitos a través de los tejidos linfáticos periféricos [14]. Las principales quimioquinas producidas por los linfocitos T productores de IL-17A son CXCL1, CXCL2, CXCL5 y CCL20, siendo esta última la quimioquina más característica de todas las producidas por las células Th17.

La quimioquina conocida como MIP-3α (macrophage inflammatory protein-3α), o como se la ha renombrado, CCL20, junto con su receptor CCR6 [15, 16] actúan en células Th17 atrayendo otro tipo de células como son linfocitos T de memoria entre otros hacia los lugares donde se localiza la inflamación [17]. Los receptores de quimioquinas más representativos expresados en la membrana de la subpoblación

Th17 son CCR6 y CCR4 [8, 18]. Todas las células Th17 efectoras y de memoria tanto de sangre periférica como de tejidos inflamado expresan CCR6 [18].

Por otro lado, los receptores de IL-1 (IL-1R1) [19] e IL-23 (IL-23R) [8, 18] son expresados en la superficie de las células Th17. La IL-1 es una citoquina pleiotrópica que actúa sobre un gran número de células, y la expresión de su receptor, IL-1R1 en células dendríticas se ha documentado como una característica importante en el inicio de la miocarditis autoinmune [20], un desorden autoinmune mediado por células Th17 [21]. Así pues, en un principio, la IL-1 se describió como una citoquina importante en el proceso de generación de células Th17 “in vivo”. Además, en modelos experimentales donde se utilizaron ratones que desarrollaban artritis de manera espontánea tras someterlos a estrés, se observó una elevada expresión de IL-1R1 en células Th17 [22]. Ya en 2009, Chung et. al. demostraron que la expresión de IL-1R1 en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes, y no en células dendríticas, era necesaria para una diferenciación temprana de células Th17 “in vitro” y para mantener la expresión del perfil de citoquinas en células Th17 efectoras. Por otro lado, la capacidad de la IL-1 para diferenciar células T CD4<sup>+</sup> vírgenes hacia células Th17 tiene un efecto sinérgico con IL-6 y/o IL-23. Pero la característica más importante de la IL-1 es su capacidad para aumentar los niveles de expresión de los factores de transcripción IRF4 y ROR $\gamma$ t durante el proceso de diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes a células Th17 [23].

Además, la IL-1 también interviene en el proceso de conversión de células T Foxp3<sup>+</sup> hacia células productoras de IL-17A. Sin embargo, la IL-1 no inhibe ni induce la expresión de Foxp3 (forkhead box P3) en respuesta a TGF $\beta$ , indicando de esta manera que el mecanismo de expresión de IL-17A mediado por IL-1 es diferente al mediado por IL-6 [23]

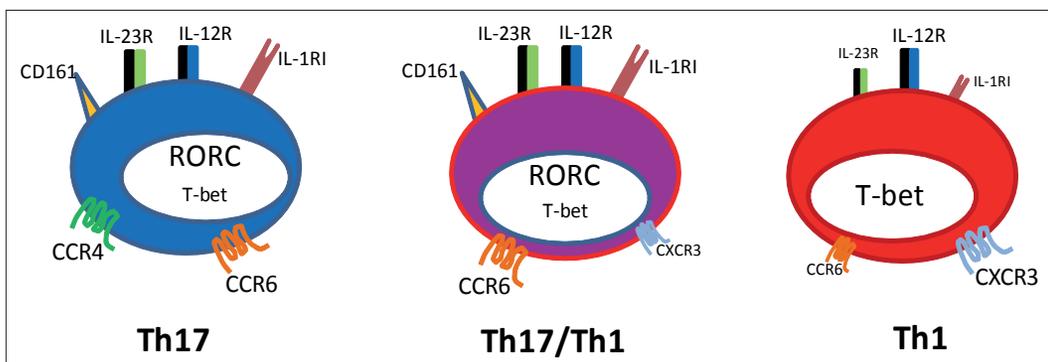
Por otro lado, la IL-23 es una citoquina no necesaria para la diferenciación de células T productoras de IL-17A, pero sí indispensable para aumentar su crecimiento, supervivencia y funciones efectoras [24, 25]. La IL-23, es un heterodímero compuesto por las subunidades p40 y p19 [6]. La IL-12 es otro heterodímero formado también

por dos subunidades, p40 y p35. Ambas comparten la subunidad p40. IL-12 e IL-23 son producidas, en su mayoría, por células del sistema inmune innato, como son las células dendríticas y macrófagos [26]. Sus receptores son heterodímeros similares, ya que la IL-12 está integrada por las subunidades IL12R $\beta$ 1 y IL-12R $\beta$ 2, y el receptor de la IL-23 por IL-23R (p19) e IL-12R $\beta$ 1 [27]. Experimentos realizados con ratones deficientes en la subunidad IL-12p40, mostraron una carencia tanto de IL-12 como de IL-23 [5, 26], en cambio, ratones deficientes en IL-23p19 son susceptibles a enfermedades autoinmunes [28]. De esta manera se demostró que la IL-23, pero no la IL-12, posee un papel crítico en el desarrollo de enfermedades autoinmunes órgano específicas [5, 27]. Estudios posteriores revelaron que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados con IL-23 producían IL-17A [5, 6], mientras que los estimulados con IL-12 sólo promovían una producción residual de la misma [5].

Otra característica fenotípica de las células Th17 humanas es el receptor de tipo lectina CD161 (análogo de NKR-P1A en ratones) [9]. Este receptor se expresa en la superficie de prácticamente todas las células Natural Killer (NK) y sobre un pequeño porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, siendo todas ellas positivas para el marcador de superficie CD45RO<sup>+</sup> (células de memoria) [29]. Este marcador, CD161, se ha identificado en células productoras de IL-17A de diferentes enfermedades inflamatorias crónicas, como Artritis y Esclerosis Múltiple entre otras [22].

Además, los linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD161<sup>+</sup> secretan niveles más altos de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-5 e IL-10 que los CD4<sup>+</sup>/CD161<sup>-</sup>, y los linfocitos T CD8<sup>+</sup>/CD161<sup>+</sup> no presentan capacidad citotóxica, aún expresando perforina y granzima A [30]. Por otro lado, las células T humanas de sangre periférica de individuos sanos que expresan IL-17A (Th17) son CD161<sup>+</sup>, no sólo en linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> (las células Th17 típicamente caracterizadas) sino también en linfocitos T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> [31]. En 2009, Annunziato et. al. sugieren en sus experimentos que las células Th17 se diferencian a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD161<sup>+</sup>, detectables tanto en el cordón umbilical, como en el timo. Más concretamente, las células T vírgenes CD4<sup>+</sup>/CD161<sup>+</sup> podían diferenciarse

hacia células Th1, Th2 ó Th17 dependiendo de las citoquinas presentes en el medio. En cambio, las células T CD4<sup>+</sup>/CD161<sup>-</sup> sólo podrían diferenciarse hacia células Th1 ó Th2, y no hacia Th17 [32]. Por el contrario, otros autores indican que la mayoría de las células productoras de IL-17A procedentes de biopsias celíacas son CD161<sup>-</sup> [33]. Estas diferencias pueden deberse al tiempo de cultivo de las células hasta el análisis de la expresión de CD161. Así mismo, el hecho de que las células productoras de IL-17A encontradas en 2010 por Monteleone et. al. también produjeran IFN $\gamma$ , es decir, que no fueran células Th17 clásicas, puede explicar la reducción en la expresión de CD161 por parte de la subpoblación Th17.



*Esquema 1.- Fenotipo, factores de transcripción y receptores de células Th17, Th17/Th1 y Th1. El tamaño de los receptores indica su grado de expresión. Annunzito. F. et. al. Eur. J. Immunol. 2009.*

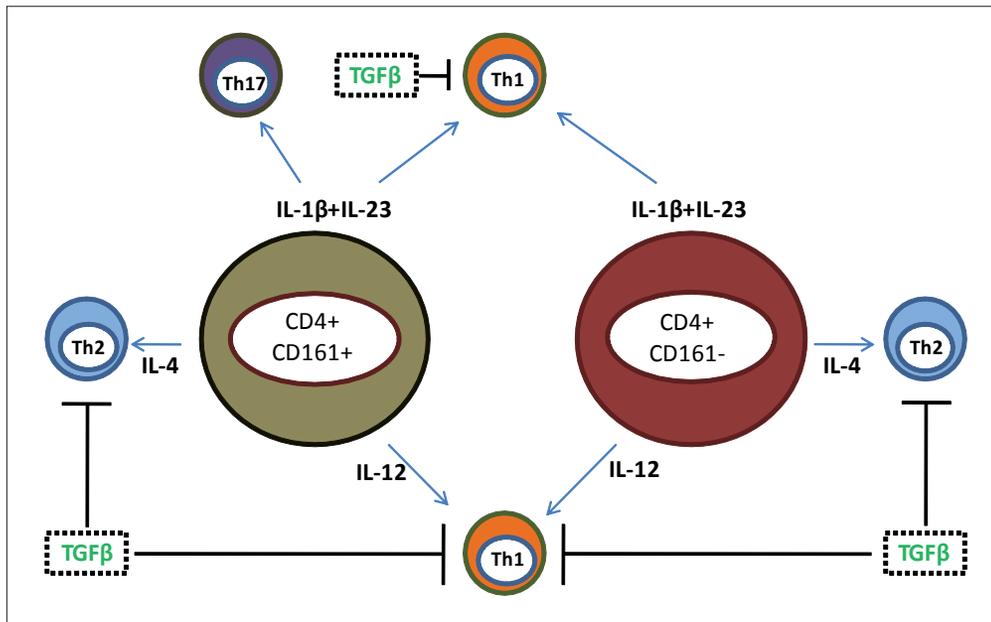
La combinación de citoquinas presentes en el medio es determinante para la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes hacia sus diferentes subtipos. No obstante la diferencia fundamental existente entre la diferenciación de las células Th17 de humanos y de ratones radica en el papel que desempeña el TGF $\beta$ . TGF $\beta$  es una proteína homodimérica perteneciente a la superfamilia de factores de crecimiento. Es producida por una gran variedad de células como plaquetas, células endoteliales, linfocitos y macrófagos. Su función biológica más estudiada es la inhibición de la proliferación y diferenciación de los linfocitos T, además de la activación de los macrófagos. TGF $\beta$  también actúa sobre otras células como neutrófilos y células endoteliales, en gran

medida para contrarrestar los efectos de las citoquinas proinflamatorias presentes en el medio. Mediante estas acciones, TGF $\beta$  inhibe respuestas inflamatorias [14]. En 2007, nuevos estudios sugirieron que las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes humanas de sangre periférica se polarizaban hacia Th17 a través de una activación mediada por IL-1 $\beta$  e IL-6, ó IL-1 $\beta$  con IL-23 sin la necesidad de la presencia de TGF $\beta$ , ya que éste en realidad inhibía esta diferenciación [7, 34-36]. En 2008, se evidenció el importante papel que desempeña el TGF $\beta$  en la diferenciación hacia Th17, de tal manera que la combinación de TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-21 ó TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$  e IL-23 eran necesarias y suficientes para inducir la diferenciación a células Th17 a partir de células T CD4<sup>+</sup> humanas de sangre de cordón umbilical [37].

Por otro lado, se observó que la asociación de TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-23 e IL-6 “in vitro” induce la diferenciación de células Th17 en humanos, indicando además que esta combinación modulaba la expresión de citoquinas producidas por los linfocitos T IL-17A<sup>+</sup> [38]. Finalmente, y también en 2008, se demostró mediante ensayos “in vitro” con células T humanas, que la presencia única de TGF $\beta$  e IL-21 bastaba para diferenciar linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes hacia células Th17 [39].

Posteriormente a estos estudios, ensayos en modelos murinos mostraron otra función de TGF $\beta$  relacionada también con la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive hacia la subpoblación celular Th17. Estos experimentos se iniciaron a partir de células T vírgenes de ratón CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> procedentes de cordón o de timo, a las que se indujo a diferenciarse a células Th1 o Th2 añadiendo al medio IL-12 o IL-4 respectivamente. Por otro lado también se polarizaron linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD161<sup>-</sup> a Th1 en presencia de IL1 $\beta$ , IL-23 ó IL-12 y hacia Th2 aportando al medio IL-4. Los resultados obtenidos de los ensayos mostraron que las células T CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> se activaban y diferenciaban a linfocitos Th17 en condiciones libres de suero (para eliminar la presencia residual de TGF $\beta$ ) y añadiendo al medio IL-1 $\beta$  e IL-23, pero no TGF $\beta$ . Esta combinación provocaba el aumento de la expresión de ROR $\gamma$ t, IL-23R, T-bet e IL-12R $\beta$ 2, provocando así un incremento en el desarrollo del número de células Th1, sugiriendo una relación entre células Th1 y Th17. La adición de TGF $\beta$  a un cultivo libre de suero que contiene IL-1 $\beta$

e IL-23 aumenta el número de células T CD161<sup>+</sup> que se diferencian a Th17 pero inhibe la expresión de T-bet y en consecuencia el desarrollo de Th1. Este hecho sugiere que Th1 y Th17 se comportan de manera diferente con respecto a la habilidad supresora de TGFβ. En resumen, TGFβ inhibe la diferenciación de Th1 y Th2, favoreciendo la de Th17 indicando una diferente susceptibilidad a la capacidad anti-proliferativa del TGFβ [32, 40], tal y como se refleja en el Esquema 2.



Esquema 2.- Vías de diferenciación de células CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>. Annunzito. F. et. al. Eur. J. Immunol. 2009.

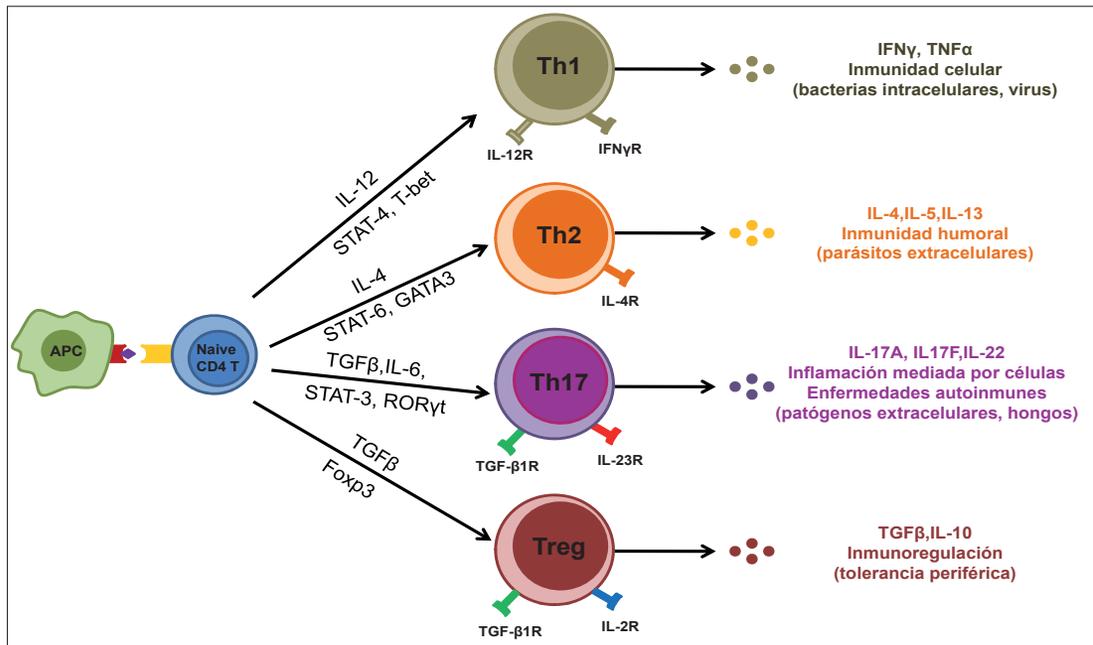
Además de las funciones anteriormente descritas de TGFβ en relación a la diferenciación de células Th17, la presencia de esta citoquina en el medio celular puede inducir a células T CD4<sup>+</sup> naive a diferenciarse hacia otro subtipo celular, las células T reguladoras (Treg). Esta subpoblación actúa de manera esencial en el proceso de tolerancia frente antígenos propios, ya que inhibe la activación del sistema inmune y mantiene su homeostasis [41].

Las células T reguladoras expresan Foxp3 (forkhead box P3) como factor de transcripción fundamental para su desarrollo [10, 41-43] que se activa, como bien se ha indicado más arriba, con la presencia de TGF $\beta$  en el medio celular [44, 45], el cual, en ausencia de IL-6 bloquea la actividad de ROR $\alpha$  y ROR $\gamma$ t ( ó RORC en humanos), conduciendo a las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes a diferenciarse a células T reguladoras [45].

Las células Treg también pueden expresar citoquinas proinflamatorias como son IFN $\gamma$  e IL-17A. Este hecho indica que las células Treg Foxp3<sup>+</sup> no son una subpoblación homogénea, ya que pueden o no coexpresar T-bet o STAT3 junto con Foxp3 para controlar las diferentes subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> efectoras [46-48], de tal manera que podemos decir que existe una relación entre células reguladoras Foxp3 y células efectoras Th17, o bien que comparten una etapa intermedia en su desarrollo [49]. Actualmente sabemos que no sólo el TGF $\beta$  interviene en la relación existente entre linfocitos Treg y Th17, sino que otras citoquinas inflamatorias como la IL-6 e IL-21 inhiben la generación de Treg cuando están mediadas por TGF $\beta$  [50-52], es decir, que IL-6 e IL-21 tienen como una de sus funciones dirigir el desarrollo de células Th17, y retener o mantener el de células Treg, interfiriendo en el balance entre los factores de transcripción RORC y Foxp3 [39, 41, 43, 53].

A su vez, el descubrimiento de células T humanas IL-17A<sup>+</sup>/ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> con actividad supresora aporta una nueva visión a la relación entre estas dos subpoblaciones, en la cual, podría conferirse a las células T productoras de IL-17A una dualidad en sus funciones [54]. Una hipótesis sobre esta dualidad funcional es que las células diferenciadas vía Th17 o Treg podían presentar funciones proinflamatorias o supresoras dependiendo de los estímulos que les llegan. De igual forma, no se puede excluir la posibilidad de que cada una de estas subpoblaciones de células T que expresan una combinación única de moléculas efectoras representa una subpoblación, pero esta plasticidad de los linfocitos T en su respuesta está estrechamente relacionada con la combinación de citoquinas que se producen durante la respuesta adaptativa. Probablemente, las células T productoras de IL-17A participen en todos los niveles (pro

y antiinflamatorios), según sea necesario, ya que parecen tener una fuerte disposición hacia programas de desarrollo particulares, produciéndose en las células productoras de IL-17A gran número de cambios, entre los que destacan alteraciones en su capacidad de proliferación y activación de la muerte celular inducida por activación. No obstante se ha sugerido que todos estos cambios que experimentan las células T podrían ser debidos a causas epigenéticas [49].



Esquema 3.- Posibles vías de diferenciación de células Th1, Th17 y Treg.

Desde un punto de vista diferente al de su diferenciación, una característica importante a tener en cuenta sobre las células Th17 estudiadas en enfermedades humanas, indica que un elevado porcentaje de esta subpoblación celular es doblemente positiva para IL-17A e IFN $\gamma$ , siendo la secreción de esta última citoquina una propiedad común de todas las células Th1. A este grupo celular se le denomina células “Th17/Th1” [8, 18, 55, 56]. Annunziato et. al. estudiaron la presencia de los receptores de quimioquinas CCR6 (característico de la subpoblación celular Th17) y CXCR3 (que se expresa de manera característica en linfocitos Th1) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de

sangre periférica de individuos sanos. Tras sus ensayos concluyeron que los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup> son mayoritariamente Th17, mientras que las células T CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup> pertenecen a la subpoblación Th1. Así mismo, aquellos linfocitos T CD4<sup>+</sup> que eran doblemente positivos para CCR6<sup>+</sup> y CXCR3<sup>+</sup> podían ser tanto células Th17/Th1 como Th1 [57]. La posible relación entre ambas subpoblaciones en términos de su origen común, es relevante para de una mejor comprensión de su papel en la patogenia de enfermedades autoinmunes.

Si bien se ha generado un importante cuerpo de información sobre la caracterización y función de las células Th17, muy poco es conocido aún sobre sus homólogas en la subpoblación CD8<sup>+</sup> entre las que se ha identificado un subgrupo de células productoras de IL-17A, conocidas con el nombre de Tc17 [58-60].

Como se ha indicado anteriormente, la mayoría de los datos disponibles sobre células Tc17 proceden de modelos experimentales, aunque la presencia de estas células en diferentes patologías humanas también se ha documentado [61-64]. Los estudios realizados en los últimos años a cerca de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IL-17A han demostrado que la generación de Tc17 tanto en ratones como en humanos depende, al igual que la de Th17, de los factores de transcripción STAT3, IRF4 y ROR (ROR $\gamma$ t en ratones y RORC en humanos) [11, 44, 53, 59, 65, 66].

Ensayos con ratones, a los cuales se les silencia el factor de transcripción STAT3, ven reducida su capacidad productora de IL-17A mediada por la combinación de IL-6, IL-21 y TGF $\beta$  en células Tc17. Por el contrario, bajo estas mismas condiciones de silenciamiento, la expresión de granzima B e IFN $\gamma$  se ve aumentada, con lo que se piensa que STAT3 puede estar implicado en la diferenciación de Tc17 [67, 68].

Con respecto a su diferenciación, la combinación de citoquinas necesarias para que las células T CD8<sup>+</sup> naive se diferencien a Tc17 es la misma que para inducir hacia células Th17, es decir, IL-6 más TGF $\beta$ , tanto en ratones como en humanos [66, 69-71]. Así mismo, estudios en humanos sobre la presencia de células T CD8<sup>+</sup> productoras

de IL-17A en diferentes patologías ha puesto de manifiesto que todos los linfocitos Tc17 expresan CCR6<sup>+</sup>, CD161<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup> e IL-23R<sup>+</sup>, y no CD28<sup>+</sup> y CD45RA<sup>+</sup>, esto es, son linfocitos con fenotipo efector/memoria. El patrón de citoquinas característico de las células Tc17 humanas y murinas es esencialmente el mismo que secretan al medio su homólogo CD4<sup>+</sup>, es decir, IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21 e IL-22 [61, 62], siendo la presencia de IL-23 necesaria, de igual manera que lo es para los linfocitos Th17, en el proceso de maduración de células Tc17, además de para todas sus funciones efectoras [72].

Las células T productoras de IL-17A, CD4<sup>+</sup> (Th17) y CD8<sup>+</sup> (Tc17), tanto en ratones como en humanos, se centran en la movilización, reclutamiento y activación de neutrófilos, además de inducir la producción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias en células epiteliales, endoteliales y macrófagos [73]. Estudios en modelos murinos muestran como las células Th17 median en la protección contra bacterias extracelulares y hongos [74, 75], además de en patologías inflamatorias autoinmunes [76, 77].

En la protección frente a infecciones por hongos como *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, la respuesta Th17, incrementada por la presencia de IL-23, actúa inhibiendo la respuesta Th1 [74], ya que la inmunopatogénesis de algunas infecciones fúngicas se ha asociado comúnmente a otro tipo de respuestas Th1, Th2 ó Treg [78, 79]. Por otro lado, y también en modelos murinos “in vivo”, *Klebsiella pneumoniae* provoca una infección bacteriana en el pulmón que promueve una sobreexpresión de IL-17A en el mismo. Esta IL-17A producida aumenta la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), generando mecanismos de defensa mediante la movilización de leucocitos polimorfonucleares hacia el lugar de la infección [80]. La IL-17A interviene en la formación de abscesos intra-abdominales y en el reclutamiento de neutrófilos en respuesta a bacterias gram-negativas, como por ejemplo *Bacteroides fragilis* [81].

Recientemente también se ha descubierto la presencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IL-17A en tumores humanos, aunque la regulación de los mismos aún no se conoce en profundidad. Concretamente la IL-17A se encuentra en células de carcinoma hepatocelular humano (HCC), donde promueve la progresión tumoral induciendo procesos de angiogénesis. Los monocitos tumorales activados secretan al medio IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23, que promueven la proliferación de células Tc17 que constituyen una parte importante de los linfocitos T que infiltran estos tumores. Más del 80% de estos Tc17 coexpresan IFN $\gamma$ , secretando gran cantidad de citoquinas proinflamatorias como IL-17A, IL-2, IL-22 y TNF $\alpha$ , pero reduciendo la producción de granzima B y perforina, características que desembocan en una importante acción proinflamatoria [63].

La inflamación es la característica básica de enfermedades autoinmunes [28, 82]. La susceptibilidad para desarrollar una enfermedad autoinmune se relaciona con factores ambientales, como por ejemplo, la alimentación e infecciones, y de factores genéticos entre los que destacan los genes del MHC y más recientemente polimorfismos de un número creciente de secuencias de DNA generalmente correspondientes a promotores de genes relacionados con diferentes elementos del sistema inmune, tales como citoquinas etc [14].

En la respuesta inflamatoria en estas patologías, en términos generales, se encuentran involucradas moléculas asociadas a células T productoras de IL-17A, que en contra de lo que se pensaba hasta el momento, también protegen de la destrucción masiva del tejido afectado [83]. Por ejemplo, en enfermedades autoinmunes mediadas por células T como la Uveitis Humana (EAU) o la Encefalitis Alérgica Experimental (EAE), los linfocitos Th17 participan en la inflamación si se activan en presencia de IL-23, mientras que si esta inducción se produce a través de TGF $\beta$  e IL-6, las células Th17 no son susceptibles de intervenir en tales enfermedades [24, 83].

El estudio de la presencia de IL-17A en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD) ha aportado luz al papel fisiopatológico que desempeña esta citoquina en la enfermedad. Modelos experimentales donde ratones alterados genéticamente para la expresión de IL-17A (IL-17a<sup>-/-</sup>) y su receptor IL-17RA (IL-17ra<sup>-/-</sup>) y para IL-17F (IL-17f<sup>-/-</sup>), a los que se ha inducido colitis, concluyen con la evidencia de que los animales deficientes en IL-17A presentaron un mayor daño en el epitelio intestinal que los que son deficientes en IL-17F. Este hecho parece indicar que la IL-17A desempeña un papel protector frente a la enfermedad, mientras que IL-17F contribuye a la producción de daño tisular. La deficiencia en IL-17A conduce a la activación del factor de transcripción T-bet y a la expresión de moléculas solubles asociadas a células Th1, como el IFN $\gamma$ , hechos que tienen una relación directa con el aumento del daño epitelial en el intestino. Así mismo, el infiltrado celular inflamatorio presente en el tejido del colon en ratones IL-17a<sup>-/-</sup> e IL-17ra<sup>-/-</sup> era el mismo que presentaban ratones no alterados genéticamente o silvestres, demostrando por tanto, que la IL-17A no es requerida para provocar la infiltración celular y la inflamación del colon en este sistema experimental [83].

También en artritis reumatoide (RA) la IL-17A desempeña un papel esencial en la inducción de la inflamación debido a su producción de citoquinas y quimioquinas [84], además de ser muy importante en los procesos de quimiotaxis [85]. En modelos murinos se ha demostrado que la IL-17A producida en los espacios articulares de animales afectados de RA aumentaba la migración de neutrófilos hacia las articulaciones del animal [85]. Por otro lado, poco se conoce sobre la quimiotaxis de monocitos mediada por IL-17A en artritis reumatoide, aunque experimentos in vitro con ratones muestran como la presencia de IL-17A tiene actividad quimiotáctica sobre monocitos en las mismas concentraciones existentes en el líquido sinovial de RA. Además, experimentos que bloquean la IL-17A o sus receptores con anticuerpos neutralizantes resultan en una disminución del flujo migratorio de monocitos hacia el líquido sinovial [86].

Así pues, las subpoblaciones de linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) productores de IL-17A han cobrado carta de naturaleza, no solo por tratarse de una población de linfocitos que sigue un camino propio de diferenciación, sino también por su posible implicación en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes [6, 87-89].

La Psoriasis y la Celiaquía son dos patologías en las que no ha sido explorado en profundidad el papel de la subpoblación Th17. Por ello hemos abordado en nuestro trabajo el estudio del posible rol de las células productoras de IL-17A en la patogenia de ambas enfermedades, que comparten como característica común su alta incidencia y prevalencia en nuestro medio.

# *Psoriasis*

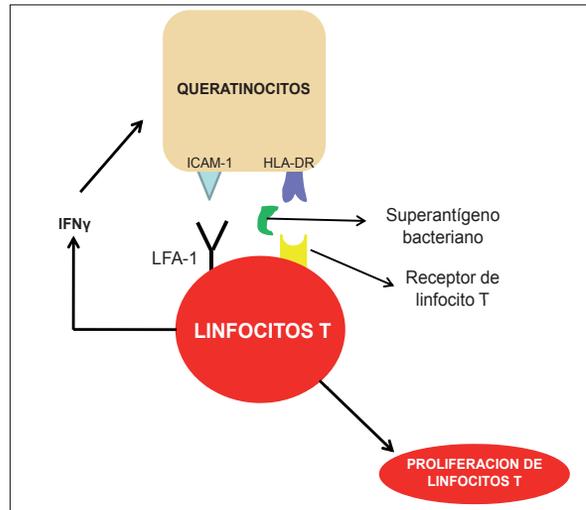


La Psoriasis es una enfermedad exclusivamente humana caracterizada por la inflamación crónica de la piel. Es una dermatosis común que afecta al 2-4% de la población mundial. La variante clínica más común es la llamada Psoriasis vulgaris, que afecta aproximadamente del 85-90% de todos los casos. Sus lesiones son placas rojas, descamativas y elevadas en diferentes localizaciones del cuerpo. Desde el punto de vista histológico, la psoriasis incluye la presencia de neutrófilos en el estrato córneo además de un significativo infiltrado mononuclear en la dermis y epidermis. También aparecen en la lesión psoriásica la adhesión a las células endoteliales activadas de gran cantidad de linfocitos, monocitos y neutrófilos [90]. Otras características histológicas de las placas psoriásicas son el engrosamiento de la epidermis (acantosis) como resultado de una hiperproliferación de queratinocitos (parakeratosis) [91]. El infiltrado inflamatorio que caracteriza a la patología se compone por linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  que penetran en el parénquima de la piel debido a un aumento de la permeabilidad vascular [92]. Patológicamente, la angiogénesis, aparece durante situaciones de crecimiento tumoral o inflamación crónica, siendo necesaria para el desarrollo de la enfermedad [93, 94].

Durante la década de los 90, la psoriasis se relacionó con la participación en la misma de superantígenos, que son proteínas bacterianas o víricas que se caracterizan por su capacidad para estimular un gran número de linfocitos T mediante una interacción atípica con el TCR de estos [95]. Así, en 1993 se detectó por primera vez una elevada cantidad de linfocitos T  $V\beta 2^+$  en lesiones psoriásicas en comparación con muestras de piel de individuos sanos [96].

Aunque en aquel momento, al igual que ahora, no se conocía la causa de la enfermedad, diferentes trabajos relacionaron a la psoriasis con infección por estreptococo [97, 98]. Es más, se determinó que todas las características clínicas e inmunológicas de la psoriasis se podrían explicar por la presencia de superantígenos derivados de estas bacterias además de por una compleja red de citoquinas que desencadenarían la activación de queratinocitos [99]. Durante este periodo se realizaron ensayos en los que células T cultivadas en presencia de superantígenos bacterianos se activaban y proliferaban al cocultivarlas con queratinocitos tratados con  $IFN\gamma$ , que induce la

expresión de HLA de clase II [100].



*Esquema 4.- Modelo de interacción entre queratinocitos y linfocitos T mediada por moléculas de adhesión. Nicholoff. B. et. al. Journal of Dermatological Science. 1993*

En 1995 se propuso que la psoriasis se originaba mediante superantígenos de estreptococo y se mantenía debido al reconocimiento de la proteína-M de la bacteria por parte de las células T presentes también en las amígdalas de los pacientes [101]. Años más tarde se demostró la asociación entre infecciones por estreptococo y una forma clínica de psoriasis aguda (psoriasis gotata), de tal manera que la incidencia de las infecciones por estreptococo que precedían a este tipo de psoriasis se extendía entre un 56% y un 97% [102]. Hoy en día, y tal y como se ha indicado anteriormente, aún no se conoce cuál es la causa que desencadena la enfermedad [103] aunque existen diferentes teorías acerca de su patogenia.

Por un lado se piensa que son las citoquinas las que dirigen los diferentes procesos que implican a las células del sistema inmune, más concretamente a células dendríticas y linfocitos T [99, 104-106], aunque por otro lado se cree que podría tratarse de una regulación alterada entre queratinocitos y el infiltrado celular inflamatorio la responsable de producir las citoquinas y quimioquinas inflamatorias que desarrollan

la enfermedad psoriásica [107]. La prevalencia de la enfermedad en la población puede ser debido a un componente hereditario [108]. Existen 9 locis cromosómicos que son significativos para la psoriasis, a los cuales se les ha denominado PSOR1 - PSOR9 [109]. El locus más relevante en psoriasis parece ser PSOR1, que explica entre el 35-50% de la heredabilidad de la enfermedad. PSOR1 se localiza dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH) en el cromosoma 6 [110]. Así mismo se ha reseñado recientemente que más del 60% de los pacientes psoriásicos presentan uno o dos alelos HLA-CW\*0602 de clase I, alelo que parece conferir una importante susceptibilidad a la enfermedad [111].

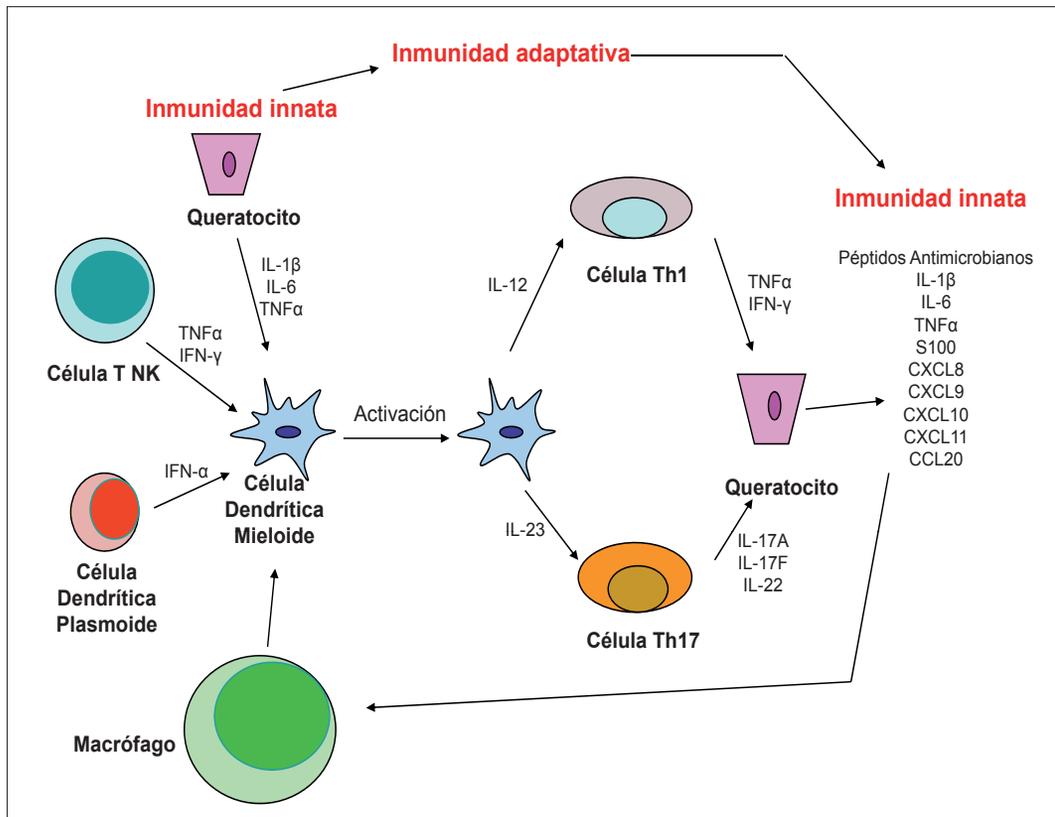
Dos son los tipos celulares que fundamentalmente participan en la formación de la lesión psoriásica, los queratinocitos y los leucocitos mononucleares, además de otras células como son las células dendríticas y macrófagos. El aumento en número de estas células en las placas psoriásicas sugiere que podrían desempeñar funciones patogénicas en la enfermedad [105]. Los queratinocitos son una barrera de protección de la respuesta innata. Representan el 80% de las células de la epidermis, conformando una barrera física frente a la penetración de microbios y alérgenos. La tasa basal de mitosis de queratinocitos en piel psoriásica está incrementada con respecto a piel normal [107].

Las células dendríticas están presentes en los órganos linfáticos, en los epitelios de la piel y de los aparatos digestivo y respiratorio, así como en la mayor parte del parénquima de los órganos. Se identifican morfológicamente por sus proyecciones membranosas. Su función consiste en captar antígenos proteicos microbianos y transportarlos a los ganglios linfáticos. Estas células maduran para hacerse eficientes en la presentación antigénica y en la estimulación de linfocitos T vírgenes. Si la barrera epidérmica que crean los queratinocitos se rompe, los antígenos y patógenos entran en contacto con las células dendríticas, que también están incrementadas en número en lesiones psoriásicas e inducen a la proliferación de linfocitos T [112]. Las células dendríticas activadas de la placa psoriásica producen una elevada cantidad de  $IFN\alpha$ , citoquina proinflamatoria que participa activamente en la formación de la lesión

[113]. Se sabe que las células dendríticas inducidas a través de IL-1 $\beta$  e IL-23 son las responsables de la polarización de células T productoras de IL-17A [56].

Otra cuestión clave concerniente a la naturaleza autoinmune de la psoriasis es la contribución de las células T autoreactivas al proceso de la enfermedad. La psoriasis es probablemente una de las enfermedades mejor caracterizadas dentro de un espectro de enfermedades autoinmunes que se distinguen por una inflamación crónica en ausencia de antígeno conocido. Los linfocitos T psoriásicos producen fundamentalmente IFN $\gamma$  e IL-17A, aunque en un principio se aceptó que la psoriasis era una enfermedad mediada por células Th1 y que producían IL-12 e IFN $\gamma$  [90], pero posteriormente otros dos subtipos celulares, Th17 y Treg se identifican como componentes importantes que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad [114, 115], y ninguno de estos tipos celulares se han encontrado en piel adyacente a lesiones psoriásicas [116, 117]. La existencia y caracterización de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IL-17A (linfocitos Tc17) en placas psoriásicas se ha demostrado recientemente [62, 116, 117]. Todas las células T productoras de IL-17A descritas en esta patología presentan en su superficie CD161, y acceden a la piel debido a su expresión de receptores de quimioquinas CCR4 y CCR6, que median la quimiotaxis a las quimioquinas CCL17 y CCL20 respectivamente [18, 118].

Así mismo, se ha observado que en psoriasis, los linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) productores de IL-17A coexpresan IFN $\gamma$  [10, 62, 116, 119, 120]. Así, Zaba et. al. mostraron que células dendríticas procedentes de la dermis de lesiones psoriásicas inducen a poblaciones de linfocitos T activados a producir simultáneamente IL-17A e IFN $\gamma$ , mientras que este fenómeno no se presentaba en linfocitos T activados con células dendríticas aisladas de piel sana [120]. Por el contrario, Kagami et. al. indican que las células Th17/Th1 representan una subpoblación infrecuente (0.01%) de células T CD4<sup>+</sup> en sangre periférica de individuos sanos, y menos de un 0.2% en sangre periférica de individuos psoriásicos. Sus resultados le llevan a concluir que el desarrollo de células para IL-17A<sup>+</sup> e IFN $\gamma$ <sup>+</sup> puede ser una característica inmunológica de psoriasis y no necesariamente un fenómeno general de inflamación dérmica [121].



Esquema 5.- Células y mediadores claves que intervienen en la patogénesis de la psoriasis. Nestle. F. et. al. *The New England Journal of Medicine*. 2009

El inicio de la enfermedad parece deberse a la acción de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 etc, que activarían a las células dendríticas, secretando éstas a su vez IL-12 e IL-23. La IL-23 es una citoquina cuya expresión se encuentra aumentada en la placa psoriásica. Así, tendría su origen en la activación de queratinocitos y células dendríticas principalmente [122], y media procesos claves en la patología como son la hiperplasia, acantosis e hiperqueratosis [119, 123] ya que existe una sobreexpresión de IL-23p19 y de IL-12p40 en lesiones afectadas de psoriasis, comparándola con piel no afectada por la enfermedad [124]. El desarrollo, caracterización y función de células Th17 y el papel que desempeña la IL-23 en el desarrollo de la inflamación crónica que producen los linfocitos T productores de IL-17A conforman un núcleo importantísimo en la patología de enfermedades autoinmunes inflamatorias, y más concretamente de la

psoriasis [122]. La elevada presencia de IL-17A e IL-23 en lesiones psoriásicas indica que el eje IL-23/IL-17A es plenamente operativo en la enfermedad [56]. Una vez que las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes se diferencian a Th1 o Th17, las citoquinas secretadas por cada una de las subpoblaciones diferenciadas activan queratinocitos e inducen a los mismos a la producción de péptidos antimicrobianos, citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ ) y quimioquinas (CXCL8 y CCL20 entre otras) [125], desembocando todo este proceso en un aumento de la proliferación de los queratinocitos, y una amplificación de la respuesta inflamatoria y los rasgos clínicos de la enfermedad [103, 121, 126].

# *Celiaquía*



La enfermedad celíaca (EC) o esprue celíaco es un proceso que afecta a la mucosa del intestino delgado. Se produce en pacientes genéticamente susceptibles tras la ingestión de alimentos que contienen gluten [127]. Durante el desarrollo de la enfermedad se produce un incremento de linfocitos T en el epitelio y en la lámina propia intestinal y la atrofia de las vellosidades intestinales y la hiperplasia de las criptas [128, 129].

La única terapia efectiva es retirar el gluten de la dieta. La prevalencia mundial de la enfermedad es de alrededor de un 1%, afectando tanto a niños como a adultos. La enfermedad sintomática, activa o clásica presenta como síntomas característicos diarrea, pérdida de peso, anemia y debilidad generalizada, con o sin malabsorción, mientras que la enfermedad asintomática o silente no presenta síntomas gastrointestinales o estos no son importantes. La enfermedad silente se presenta en personas que pueden desarrollar la enfermedad en el futuro. La malabsorción producida en la celiacía conduce a un déficit de ácido fólico, hierro, calcio y vitaminas liposolubles [130].

La patogénesis de la enfermedad está asociada a factores genéticos (genes HLA y no HLA) y a factores ambientales (ingesta de gluten en la dieta).

Diversos péptidos derivados de proteínas del gluten, incluyendo gliadinas y más recientemente las gluteínas, han sido descritas como elementos capaces de activar linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentes en la mucosa del intestino delgado de pacientes celíacos [127, 131-133]. Por otro lado, los factores genéticos decisivos en el proceso de generación de la enfermedad están asociados con alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II, más concretamente alelos HLA-DQ [128]. Los enfermos con celiacía son HLA-DQ2 (90-95%) o HLA-DQ8 (5-10%). El alelo HLA-DQ2 que confiere la susceptibilidad a la enfermedad es HLA-DQB1\*02, mientras que el HLA-DQ8 está codificado por HLA-DQB1\*0302 [134, 135].

La función que realizan tanto HLA-DQ2 como HLA-DQ8 en la patogenia de la enfermedad es la presentación de péptidos del gluten a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la lámina propia del intestino delgado [135-137]. Tanto HLA-DQ2 como DQ8 presentan péptidos

cargados negativamente. Sin embargo los péptidos del gluten no presentan aminoácidos con carga negativa. La presencia de auto-anticuerpos anti-transglutaminasa tisular en el plasma de los pacientes celíacos representó la clave para desentrañar las bases moleculares de la enfermedad. La transglutaminasa tisular (TG2) es un enzima dependiente del  $\text{Ca}^{++}$  [138] que posee gran afinidad por péptidos del gluten, que en condiciones de pH ácido y en ausencia de residuos lisina cataliza la deaminación de los residuos de glutamina de los péptidos derivados del gluten convirtiéndolos en ácido glutámico, que tiene carga negativa. De esta manera el péptido enriquecido en ácido glutámico es endocitado por las células presentadoras de antígeno, lo que permite su unión eficiente a las moléculas de HLA clase II (DQ2 ó DQ8) en los endosomas y su posterior presentación a las células T gliadina-específicas provocando así la respuesta inmune patogénica [139].

Por otra parte, los linfocitos intraepiteliales (IEL) son células T  $\text{CD8}^+$  localizadas entre los enterocitos y que se encuentran en contacto con el lumen intestinal. Son las primeras células inmunocompetentes en reconocer antígenos luminales, y discriminar entre elementos inocuos y patógenos [140]. Son en su mayoría linfocitos T  $\text{CD8}^+$  que expresan un receptor de linfocitos T de tipo  $\alpha\beta$ , si bien existe otra población de IEL  $\text{CD4}^+/\text{CD8}^-$  TCR  $\gamma\delta$  que suponen un 5% del total de linfocitos que se encuentran en la mucosa intestinal [141]. Estos últimos linfocitos intraepiteliales  $\gamma\delta^+$  son una subpoblación linfocitaria inmunoreguladora [142] que tiene un papel importante en la mucosa intestinal, ya que mantienen su integridad mediante la producción de  $\text{TGF}\beta$  [143]. Los pacientes celíacos con un mayor número de células T  $\gamma\delta^+$  muestran una inflamación y sintomatología reducidas, dato que refuerza su papel supresor [140].

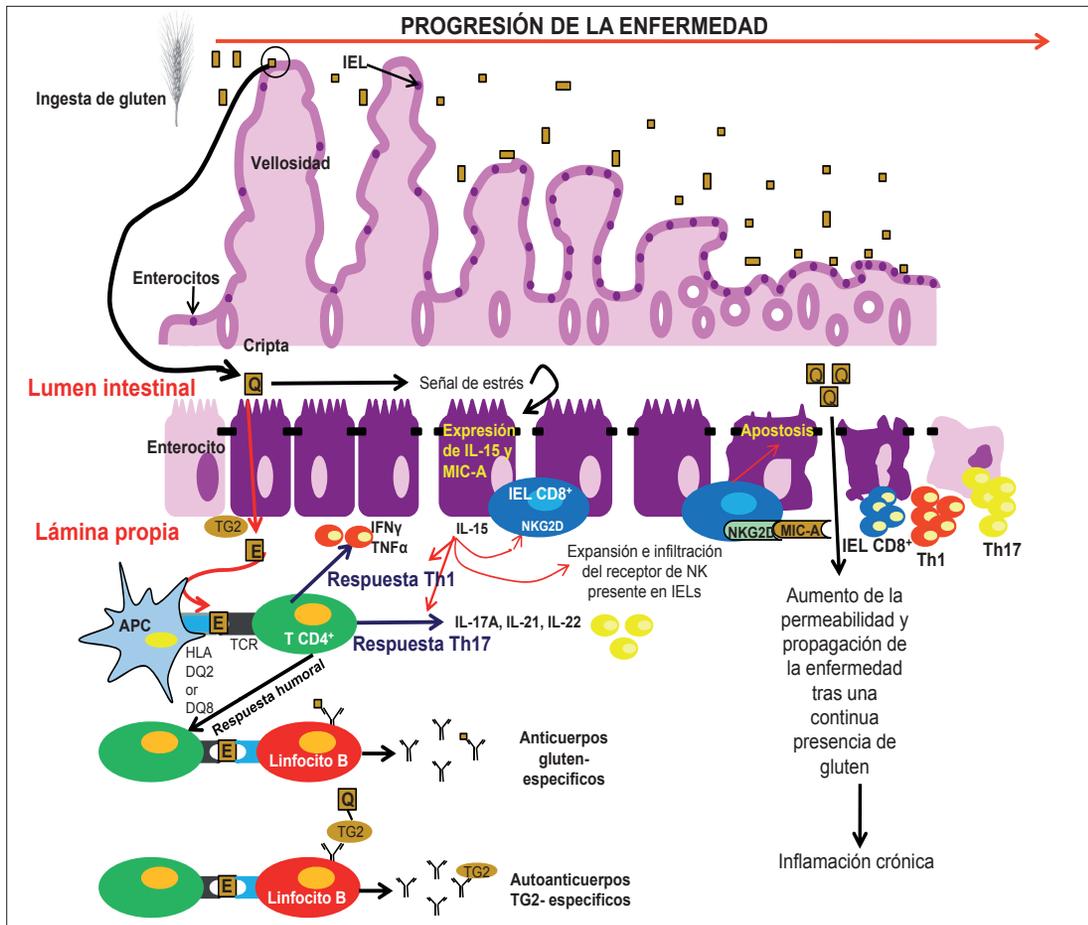
La enfermedad celíaca se produce como consecuencia de una destrucción masiva del epitelio que conduce a la atrofia de las vellosidades intestinales. Mientras que las células T  $\text{CD4}^+$  HLA-DQ2/DQ8 gluten específicas se encuentran en la lámina propia [144, 145], el epitelio intestinal es el lugar de expansión de los linfocitos T citotóxicos (CTL)  $\text{TCR}\alpha\beta$ , responsables directos del daño del epitelio que, sorprendentemente, llevan a cabo de manera no antígeno-específica [130, 146].

Por un lado, L. Shan y colaboradores [127] identificaron un péptido que inicia la respuesta inmune adaptativa frente al gluten que conduce al sprue celíaco. Este péptido conocido como 33-mer, es resistente a la degradación por los jugos gástricos, pancreáticos e intestinales, así como a las proteasas de la membrana de la luz intestinal. Se une a la enzima TG2 con una afinidad sustancialmente superior con la que se une a otros sustratos. Además es un potente inductor de la proliferación de células T gliadina-específicas obtenidas de biopsias intestinales de individuos afectados de EC, y no necesita procesamiento en las células presentadoras de antígeno para la estimulación de las células T CD4<sup>+</sup>, ya que se une a la molécula DQ2 de forma extracelular [147], desencadenando una respuesta inflamatoria, en la cual se secreta principalmente IFN $\gamma$  y otras citoquinas proinflamatorias, ayudando a las células B en sus respuesta humoral contra el péptido 33-mer y la TG2 [148-150].

En cambio, la respuesta inmune adaptativa gluten-específica anteriormente descrita no es suficiente para explicar porque existe un aumento de IELs T CD8<sup>+</sup> en el intestino celíaco activo y la muerte celular de los enterocitos que recubren el intestino, provocando así la destrucción del epitelio intestinal [148-151]. Una respuesta no antígeno específica sí lo explicaría. Así, la activación de células CD4 por péptidos del gluten reconocidos en el contexto DQ2 o DQ8 conduce a la producción de IL-15, que promueve la proliferación de IEL CD8<sup>+</sup>/TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, además de inducir a la expresión de NKG2C en su superficie, además de la expresión de la molécula de estrés celular MIC-A en los enterocitos de las microvellosidades intestinales. MIC-A es un ligando de NKG2D, receptor expresado constitutivamente por IEL. La interacción de NKG2D/MIC-A en presencia del receptor activador de citotoxicidad NKG2C provoca la destrucción por citotoxicidad de los enterocitos y eventualmente la atrofia de las microvellosidades intestinales [152-154].

Así, puede constatarse histológicamente que durante la fase activa de la enfermedad celíaca se produce un aumento de los niveles de IL-15 [155-157], un incremento en la expresión de MIC-A por parte de los enterocitos [153, 158] y un aumento de IEL CD94<sup>+</sup>/NKG2D<sup>+</sup> infiltrados en el epitelio intestinal [152]. Además se

conoce que entre todas las poblaciones de linfocitos intraepiteliales existen células T CD8<sup>+</sup> que no expresan CD28 [159], por este motivo las moléculas MIC-A expresadas en el intestino actúan como moléculas coestimuladoras para linfocitos citotóxicos del epitelio del intestino humano [160].



Esquema 6.- Modelo propuesto de patogenia de enfermedad celíaca. Modificado de Bethune et. al. Plos Pathogens, 2008.

# **Objetivos**



Como se ha indicado en la introducción, tanto la psoriasis como la celiaquía son enfermedades autoinmunes consideradas históricamente como enfermedades de tipo Th1. Sin embargo, estudios más recientes apoyan la idea de que su patogenia puede ser mediada fundamentalmente por linfocitos del subtipo celular Tc17 o Th17 respectivamente. Por todo ello, los objetivos de este trabajo son:

1. Identificación de células T productoras de IL-17A en la psoriasis y en la enfermedad celíaca.
2. Análisis funcional de las poblaciones productoras de IL-17A en ambas patologías.
3. Estudio molecular de los linfocitos T productores de IL-17A en psoriasis y celiaquía.



# **Pacientes, Material y Métodos**



## **1.- PACIENTES, CONTROLES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

### ***1.1.- PACIENTES PSORIÁSICOS***

En nuestro estudio se han incluido once pacientes diagnosticados de psoriasis moderada o severa por el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. Cinco mujeres y seis varones de edades comprendidas entre 23 y 48 años (edad media 35,5 años). Los criterios de inclusión de los pacientes en nuestro estudio fueron, a) afectación mínima del 5%-10% de la superficie corporal; b) no estar en tratamiento sistémico por lo menos 2 semanas o tópico al menos 1 semana antes de la obtención de la muestra, c) no presentar infecciones ni signos de déficit inmunológico y d) no padecer ninguna otra enfermedad [161, 162]. Las muestras control de piel se obtuvieron de abdominoplastias quirúrgicas en individuos sin antecedentes personales o familiares de psoriasis y libres de enfermedades inflamatorias de la piel (n=5). Las biopsias obtenidas pertenecían a dos mujeres y tres varones de edades comprendidas entre 36 y 52 años (edad media 37,6 años).

### ***1.2.- PACIENTES CELÍACOS***

En nuestro estudio se han incluido quince pacientes diagnosticados de enfermedad celíaca por el Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. Siete mujeres y ocho varones de edades comprendidas entre 4 y 13 años (edad media 7,5 años). Las biopsias de duodeno distal se obtuvieron durante endoscopia digestiva alta diagnóstica. Los criterios de inclusión de pacientes en nuestro estudio fueron, a) presencia de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa en plasma sanguíneo b) atrofia vellosa intestinal total o parcial c) no estar en tratamiento anteriormente a la toma de la muestra y d) HLA-DQ2 ó HLA-DQ8. Las muestras control de duodeno distal se obtuvieron de cuatro mujeres y siete varones no celíacos de edades comprendidas entre 4 y 15 años (edad media 8,6 años) durante endoscopia digestiva alta diagnóstica, (n=11).

Todas las muestras clínicas se obtuvieron siguiendo los protocolos correspondientes aprobados por el Hospital Universitario Reina Sofía y la Declaración de Principios de Helsinki.

## 2.- REACTIVOS

### 2.1.- ACTIVACIÓN CELULAR

- Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (*PMA*) (Sigma Aldrich; St. Louis, MO).
- Ionomicina (Sigma Aldrich; St. Louis, MO).
- *OKT3 (anti-CD3)* American Type Culture Collection (Rockville, MD, U.S.A.).
- Microesferas magnéticas acopladas a anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 (microesferas CD3/CD28) (Human Tcell-Expander CD3/CD28 microbeads) (Invitrogen Dynal Biotech AS. Oslo, Norway).
- Gliadina (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- Tripsina (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- Quimiotripsina (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- Trasglutaminasa (Sigma, St. Louis, MO, USA).

### 2.2.- PROLIFERACIÓN CELULAR

- 5-carboxifluorescein diacetato succinimidil (*CFSE*). (Fluka, Sigma Aldrich; Steinheim, Alemania).
- Fitohemaglutinina (*PHA*) (Sigma Aldrich; St. Louis, MO).
- Timidina tritiada, 2.0 Ci/mmol (GBp/mmol) (Perkin Elmer; Boston, MA, U.S.A.)

### **2.3.- SOLUCIONES DE LAVADO Y TAMPONES**

- Ficoll-Histopaque (*Ficol*) (Sigma Aldrich; Steinheim, Alemania).
- Solución salina tamponada con fosfato (*PBS*). (Oxoid Limited, Basingstoke; Hampshire, England).
- *Solución salina Facs Flow*. Becton Dickinson (BD), (Bioscience; San José, California).
- *BD Cytofix-Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit with BD GolgiPlug*: (BD Biosciences Pharmingen; San Diego, California, U.S.A.).
- Paraformaldehído 4%, (Sigma Aldrich; Steinheim, Alemania).
- *Tampón para la separación celular inmunomagnética*. PBS con seroalbúmina bovina 0.5% (Bovine serum albumine: BSA), y ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 2mM, (Sigma Aldrich; Steinheim, Alemania).

### **2.4.- MEDIOS DE CULTIVO**

- RPMI 1640 (BioWittaker, Lonza; Verviers, Belgium).
- Suero humano.
- Suero fetal de ternera (BioWittaker, Lonza; Verviers, Belgium).
- Glutamina (BioWittaker, Bélgica).
- Penicilina-Estreptomicina (BioWittaker, Bélgica).

- Gentamicina (Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersbourg, MD).
- HEPES (Sigma Aldrich; Steinheim, Alemania).
- Piruvato sódico (Life Technologies, Chagrin Falls, OH).
- Aminoácidos (Life Technologies, Chagrin Falls, OH).

### **2.5.- CITOQUINAS HUMANAS RECOMBINANTES**

- IL-2 (Hoffman-La Roche; Nutley, NJ, U.S.A).
- Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) (Sigma Aldrich Corp. España).
- IL-1 $\beta$  (BD Pharmingen, San Diego, California).
- IL-6 (Sigma Aldrich Corp. España).
- IL-12 (p70) (BD Pharmingen, San Diego, California).
- IL-15 (BD Pharmingen, San Diego, California).
- IL-23 (eBioscience, San Diego, California).

## **2.6.- ANTICUERPOS**

### ***2.6.1.- Anticuerpos monoclonales no conjugados con fluorocromos (Raton anti-humano)***

Anti:

- CD119 (receptor de la cadena  $\alpha$  del IFN $\gamma$ ), CD120a (receptor tipo 1 de TNF $\alpha$ ), IFN $\gamma$ , IL-4 (BD Pharmingen; San Diego, California).
- TNF $\alpha$  (Becton Dickinson .San José, California).
- IL23R (receptor de IL-23), TGF $\beta$ 1 (R&D Systems; Abingdon OX14 3NB, UK).
- IRF4 (Santa Cruz Biotechnology; California, U.S.A).

### ***2.6.2.- Antisuero policlonal***

Anti:

- RORC anti-humano hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology; California, U.S.A).

### ***2.6.3.- Anticuerpos monoclonales conjugados con Fluorescein Isothiocyanate (FITC) (Raton anti-humano).***

Anti:

- CD3, CD4, CD8, CD27, CD45RO, HLA-DR, TNF $\alpha$  (Becton Dickinson; San José, California).

- CD103, CD161, TCR $\alpha\beta$ , CLA, CCR5, perforina, granzima A, granzima B, anexina V (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen; San Diego, California).
- CCR6 (R&D Systems; Abingdon OX14 3NB, UK).

#### ***2.6.4.- Anticuerpos monoclonales conjugados con Phycoerythrin (PE) (Raton anti-humano).***

Anti:

- CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA, CD56, HLA-DR (Becton Dickinson; San José, California).
- CD28, TCR $\gamma\delta$ , NKGD2 (BD Pharmingen; San Diego, California).
- CCR2, CCR6 e IL-22 (R&D Systems; Abingdon OX14 3NB, UK).
- Foxp3 e IL-17A (e-Bioscience; San Diego, California).

#### ***2.6.5.- Anticuerpos monoclonales conjugados con Phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7) (Raton anti-humano).***

Anti:

- CD3, CD4, CD8, CD16 (Becton Dickinson; San José, California).
- CD69, IFN $\gamma$  (BD Pharmingen; San Diego, California).

### **2.6.6.- Anticuerpos monoclonales conjugados con Allophycocyanin (APC) (Raton anti-humano).**

Anti:

- CD3, CD4, CD8 (Becton Dickinson; San José, California).
- CD94 (BD Pharmingen; San Diego, California).
- IL-22 (R&D Systems; Abingdon OX14 3NB, UK).

### **2.6.7.- Anticuerpos monoclonales conjugados con Alexa Fluor 647(Raton anti-humano).**

Anti:

- IL-21 (e-Bioscience; San Diego, California).

### **2.6.8.- Controles de isotipo (IgG 1,2,3 y 4)**

Conjugados con FITC, PE, PE-Cy7 y APC (Becton Dickinson; San José, California).

## **3.- ESTUDIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

El tipaje de alta resolución HLA de clase I se realizó mediante PCR utilizando primers específicos de secuencia (PCR-SSP) (Invitrogen; Browndeer, WI, U.S.A.) y el de HLA de clase II mediante PCR utilizando oligonucleóticos específicos de secuencia (PCR-SSO) (Innogenetics; Gent, Bélgica), tanto en pacientes celíacos como en controles.

## **4.- AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS T**

### **4.1.- SANGRE PERIFÉRICA**

La sangre periférica de pacientes y controles se diluyó en PBS estéril a temperatura ambiente en una proporción 1:1. Posteriormente se dispensaron 3 ml de ficol y 7 ml de sangre diluida en tubos estériles de 10 ml y se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos a 4° C. Las células mononucleares situadas en la interfase entre el ficol y el plasma se recogieron con pipetas Pasteur estériles y se lavaron 3 veces con PBS estéril (1500 rpm durante 5 minutos). Finalmente, las células recogidas se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero humano, 1% de glutamina 2mM, 200UI/ml de penicilina y 200µg/ml de estreptomicina.

### **4.2.- PIEL**

Las biopsias de piel se incubaron durante la noche a 4°C en PBS suplementado con un 0.5% de Dispasa y 1mg/ml de Colagenasa A. Dermis y epidermis fueron separadas cuidadosamente y la dermis se cultivó durante 2 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en RPMI 1640 con un 5% de suero humano, 0.1% de Gentamicina y 1% de 1mol/L de buffer HEPES. Las suspensiones celulares epidérmicas se obtuvieron incubando la epidermis en 0.25% de Trypsin/EDTA durante 15 minutos a 37°C y durante 24 horas más para obtener células T epidérmicas.

Las células CCR6<sup>+</sup> de epidermis fueron aisladas mediante inmunoselección magnética, obteniendo así una subpoblación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> que contenía >95% de células productoras de IL-17A (CD8<sup>+</sup>IL17A<sup>+</sup>). Fueron expandidas en RPMI 1640 suplementado con 5% de suero humano, 1% de glutamina 2mM, 200UI/ml de penicilina y 200µg/ml de estreptomicina.

Las células T CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>-</sup> fueron obtenidas a partir de cultivos de dermis en presencia de microesferas CD3/CD28 (1 bola por célula T) durante 5 días.

La subpoblación celular Th17 se obtuvo a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de cordón umbilical. Las células T fueron estimuladas con microesferas CD3/CD28 (1 bola por célula T). Tras un periodo de 3-5 días fueron expandidas en presencia de IL-1 $\beta$  (5 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), TGF $\beta$  (5 ng/ml), anti-IFN $\gamma$  (10  $\mu$ g/ml) y/o anti-IL-4 (10  $\mu$ g/ml). Cada 5 días, las células se reestimularon con microesferas CD3/CD28, reponiéndose el medio de cultivo, las citoquinas y los anticuerpos neutralizantes utilizados.

#### **4.3.- INTESTINO DELGADO**

Las biopsias (3-4 explantes) de cada paciente y control fueron digeridas con 1mg/ml de Colagenasa A durante 1 hora a 37°C. Las células obtenidas se unieron en un pool y se utilizaron para detección de citoquinas intracelulares o se estimularon con 100  $\mu$ g/ml de gliadina tratada con tripsina, quimiotripsina y trasglutaminasa (de aquí en adelante gliadina), en presencia de 1x10<sup>6</sup> de PBMCs autólogas irradiadas (3500 rads) por un periodo de 7 días. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementando con un 5% de suero humano, 2mM glutamina, 1mM piruvato sódico, 1% aminoácidos no esenciales, 100U/ml penicilina y 100mg/ml estreptomina (Life Technologies, Chagrin Falls OH) en ausencia de citoquinas exógenas. De las células expandidas, la población CD8<sup>+</sup> se aisló por inmunoselección positiva mediante microesferas magnéticas acopladas con el anticuerpo monoclonal anti-CD8 (Miltenty, Alemania), y la fracción negativa, (células CD4<sup>+</sup> con una pureza >93%), se sometieron ulteriormente a inmunoselección positiva con microesferas magnéticas acopladas al anticuerpo monoclonal anti-CCR6 (Miltenty, Alemania). Para determinar la expresión intracelular de IL-17A se utilizaron 1,5x10<sup>4</sup> células de cada una de las dos fracciones, positiva (CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup>) y negativa (CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup>). La fracción CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> fue > 93% IL-17A<sup>+</sup>; la fracción CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> <2% IL-17A<sup>+</sup>. Las células de cada fracción se expandieron en presencia de gliadina (células procedentes de pacientes celíacos) o de microesferas CD3/CD28 (células de individuos no celíacos) a razón de 3 bolas por célula, en presencia de 20 ng/ml de IL-23. La IL-23 exógena fue retirada de los cultivos 72 horas antes de los experimentos.

## **5.- CITOMETRÍA DE FLUJO**

Para los ensayos de inmunofluorescencia directa, las células ( $1 \times 10^4$ - $10^5$ ) fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales relevantes a 4°C en oscuridad durante 30 minutos. Las muestras se lavaron con 1 ml de PBS estéril (1500rpm 5 minutos), se resuspendieron en 500µl de Facs Flow y se fijaron con paraformaldehído al 4%. En todos los casos, controles de isotipo y especie se incluyeron en los experimentos.

Para la inmunofluorescencia indirecta, se realizó una segunda incubación de 30 minutos a 4°C y en oscuridad con un anticuerpo isotipo-específico conjugado con el fluorocromo correspondiente en cada caso. Finalmente, las muestras fueron lavadas con 1 ml de PBS estéril (1500rpm 5 minutos), se resuspendieron en 500µl de Facs Flow y se fijaron con Paraformaldehído al 4%. En todos los casos, controles de isotipo y especie se incluyeron como control en los experimentos.

En los ensayos de inmunofluorescencia intracelular, las células T ( $1 \times 10^6$ ) se activaron con 40 ng/ml de PMA y 1µg/ml de Ionomicina durante 6 horas a 37°C en presencia de Brefeldina A. Tras este tiempo las células se recogieron y lavaron a 1500rpm 5 minutos con 1ml de PBS estéril.

Las células fueron marcadas en primer lugar en superficie con los anticuerpos monoclonales correspondientes en cada caso (30 minutos a 4°C en oscuridad) y se lavaron con 1ml de PBS estéril. Seguidamente se fijaron y permeabilizaron con BD Cytotfix-Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization con GolgiPlug. Las células se lavaron con 1ml de PBS estéril y fueron marcadas intracelularmente con los anticuerpos anti-citoquinas correspondientes (30 minutos a 4°C en oscuridad). Por último, las muestras se lavaron 2 veces con 1ml de PBS estéril, se resuspendieron en 500µl Facs Flow y se fijaron con Paraformaldehído al 4%. Se incluyeron en todos los ensayos de inmunofluorescencia intracelular células no activadas tratadas con Brefeldina A. Controles de isotipo y especie se incluyeron en todos los experimentos.

Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA), seleccionadas conforme a parámetros de tamaño y complejidad y analizadas con el software CellQuest Pro (Becton Dickinson, San José, CA, USA).

## **6.- CUANTIFICACIÓN DE IL-17A, IL-21, IL-22, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ y TGF $\beta$ .**

Las células T ( $2 \times 10^5$ ) se estimularon con microesferas CD3/CD28 (3 bolas por célula T) o con gliadina (50 $\mu$ g/ml), durante 24 horas a 37°C. Al término de este tiempo los sobrenadantes de los cultivos se recogieron, alicuotaron y almacenaron a -80°C hasta su uso.

IL-17A, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  fueron cuantificados mediante Multiplex Kit Luminex (Invitrogen; Carlsbad, CA, U.S.A.). La cuantificación de IL-21, IL-22 (Bender Medsystems, USA) y TGF $\beta$  (R&D Systems) se realizó por inmunoenzaimoensayo.

## **7.- ESTUDIOS FUNCIONALES**

### **7.1.- PROLIFERACION**

Para los ensayos de proliferación,  $5 \times 10^4$  células T fueron estimuladas con microesferas CD3/CD28 (1 bola por célula T) durante 4 días en ausencia o presencia de IL-2 (10 IU/ml), IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), IL-6 (20ng/ml), TGF $\beta$  (5 ng/ml), IL-12 (2,5ng/ml), IL-15 (7ng/ml) e IL-23 (20ng/ml). Las últimas 16 horas las células del cultivo se marcaron con 0.5  $\mu$ Ci/ pozo de timidina tritiada. Pasado este tiempo, fueron recogidas para medir su captación de timidina en un contador de centelleo líquido (Betaplate 1205, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA).

## **7.2.- ESPECIFICIDAD A GLIADINA**

Para determinar la especificidad a gliadina de células T productoras de IL-17A de enfermos celíacos, PBMCs irradiados ( $1 \times 10^6$ ) de cuatro donantes sanos HLA-DQ2<sup>+</sup> se cargaron con péptidos de gliadina a 25, 50 ó 100  $\mu\text{g/ml}$  durante una noche, tiempo tras el cual se cocultivaron durante 5 días con  $5 \times 10^4$  células T procedentes de biopsias de duodeno. La transglutaminasa nativa (Sigma) (25, 50 ó 100  $\mu\text{g/ml}$ ) se utilizó en los experimentos como control. Las células se marcaron con timidina tritiada (0.5  $\mu\text{Ci}$ /pozo) las 16 últimas horas de cultivo, tras las cuales se midió su captación de timidina tritiada en el contador de centelleo líquido.

## **7.3.- SUSCEPTIBILIDAD A CÉLULAS T REGULADORAS**

Para determinar la susceptibilidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> de pacientes psoriásicos a células T reguladoras (Tregs), éstas últimas se aislaron de sangre periférica de donantes sanos mediante dos inmunoselecciones magnéticas consecutivas, una negativa y otra positiva. En la primera inmunoselección (negativa) se utilizó un coctel de anticuerpos (anti-CD8, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56, anti-CD123, anti-TRC $\gamma\delta$  y anti-glicoforina A) conjugados con biotina y microesferas magnéticas anti-biotina (Miltenyi Bistec, Auburn, California, U.S.A.) para separar las células magnéticamente a través de columnas MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, California, USA). La fracción negativa contenía >95% de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Esta población se marcó con microesferas magnéticas acopladas con anticuerpo monoclonal anti-CD25 y se realizó una segunda separación mediante columnas MACS MS (Miltenyi Biotec, Auburn, California, USA). Las poblaciones de células Treg (CD4<sup>+</sup> 25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) obtenidas tuvieron una pureza superior al 93% en todos los casos.

Células T de piel de pacientes psoriásicos fueron marcadas con CFSE (5  $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos a 4° C y oscuridad. Pasadas 24 horas después del marcaje con CFSE, las células T se cocultivaron con células Treg en una proporción de 1:1 en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero humano, 1% de glutamina 2mM,

200UI/ml de penicilina y 200µg/ml de estreptomicina. El cocultivo se estimuló con microesferas CD3/CD28 (1 bola por célula T). Tras 5 días se determinó la proliferación de las células T CD8<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> mediante citometría de flujo (FACSCalibur) y se analizó con el software CellQuest Pro (BD Biosciences).

#### **7.4.- EFECTO DEL TNF $\alpha$ EN CÉLULAS T DE PACIENTES PSORIÁSICOS**

Para ensayos de bloqueo con anti-TNF $\alpha$ , las células T ( $5 \times 10^4$  células/ml) se estimularon con microesferas CD3/CD28 (1 bola por célula T), cultivándolas en RPMI 1640 suplementado con 5% de suero humano, 1% de glutamina 2mM, 200UI/ml de penicilina y 200µg/ml de estreptomicina en ausencia o presencia de un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  (1, 2, 4 y 8 µg/ml), durante 6 horas a 37°C. Tras este tiempo las células se marcaron con anti-CD69 para determinar la activación celular. Además se recogieron, alicuotaron y almacenaron los sobrenadantes de los cultivos a -80° C para determinar el contenido de IL-17A en los mismos.

### **8.- POLARIZACIÓN DE CELULAS T CD8<sup>+</sup> PSORIASICAS**

Las células T ( $10^6$  células) se estimularon con microesferas CD3/CD28 (1 bola por célula T), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) e IL-6 (10 ng/ml) durante 4 días en presencia o ausencia de anti-IFN $\gamma$  (10 µg/ml) y/o anti-IL-4 (10 µg/ml).

### **9.- ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD EN PSORIASIS**

La capacidad citotóxica de las células T efectoras CD8<sup>+</sup> IL17A<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> IL-17A<sup>-</sup> procedentes de biopsias de piel psoriásica ó piel sana, se determinó mediante ensayos de lisis redirigida donde se utilizaron células P815 (mastocitoma de ratón) como células diana. Las células P815 se incubaron con 5µg del anticuerpo monoclonal anti-CD3 durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Posteriormente, células efectoras y células diana fueron cocultivadas a los ratios efectora/diana (E:D) 1:1, 10:1 y 40:1 durante 4 horas a 37°C. Las células se recogieron y se marcaron con anti-Anexina V durante

30 minutos a 4°C y en oscuridad. Los resultados de muerte celular fueron evaluados determinando el porcentaje de células diana que expresaban Anexina V mediante citometría de flujo.

## **10.- MICROSCOPIA CONFOCAL**

Para determinar la colocalización en células T de IL-17A, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , RORC o IRF4 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia directa (IL-17A, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ), e indirecta (RORC e IRF4). La visualización de las células se realizó utilizando el microscopio confocal Leica SP5 (Leica Geosystems AG, Sweden) del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

## **11.- PCR A TIEMPO REAL (qPCR)**

El RNA citoplasmático de las células T fue extraído a partir de lisados celulares usando RNeasy Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) y en cada ensayo, 1 $\mu$ g del mRNA resultante fue reverso-transcrito a DNA complementario (cDNA) utilizando el sistema de transcripción reverso AMV (Promega, Madison, WI, USA). Cantidades iguales de los cDNA molde fueron amplificadas por PCR cuantitativa (qPCR) utilizando los primers especificados en la Tabla 1.

	FORWARD	REVERSE
RORC	5' agtcggaaggcaagatcaga3'	5' caagagagggttctgggcaag3'
T-bet	5' ccgtgactgectaccagaat3'	5' atctccccaaggaattgac3'
IRF4	5' gtctgagcgaaaacaggag3'	5' acccaagactcccacagttg3'
IFN $\gamma$	5' tcagctctgcatcgtttg3'	5' tctttggatgctctggta3'
TGF $\beta$	5' aagtggacatcaacgggttc3'	5' gtccttgcggaagtcaatgt3'
IL-17A	5' ccccagttgattggaagaaa3'	5' gaggacctttgggattggt3'
IL-21	5' ggcaacatggagaggattgt3'	5' aagcaggaaaaagctgacca3'
IL-22	5' ctccttctctggcccttt3'	5' gttcagcacctgcttcatca3'
HPRT1	5' accccacgaagtgttgata3'	5' aagcagatggccacagaact3'

Cada reacción contenía 5 ng de cDNA, 0,5  $\mu$ M primers y QuantiTec SYBR green PCR kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA) y se llevaron a cabo en el termociclador LightCycler 480 System (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 15 minutos fue seguido de 35 ciclos de 20 segundos/94°C, 60°C/30 segundos y 72°C/30 segundos. La expresión de la cantidad relativa del gen objetivo de estudio se calculó mediante un método comparativo tras la normalización de la expresión del gen constitutivo HPRT1.

## 12.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba del test de Wilcoxon o el test de Mann-Whitney. Las diferencias fueron estadísticamente significativas para  $p < 0,05$ .



# **Resultados**



## ***Psoriasis***



## 1.- AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> PROCECENTES DE PIEL PSORIÁSICA Y PIEL SANA.

La presencia de linfocitos Th17 (CD4<sup>+</sup>) en piel afecta de psoriasis ha sido descrita previamente [114]. Nuestro trabajo muestra la existencia de una población incrementada de linfocitos T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> en piel de pacientes con psoriasis en comparación con individuos sanos. A partir de la epidermis de 11 biopsias de piel de pacientes psoriásicos y 5 de piel de individuos sanos hemos identificado células CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17A mediante citometría de flujo multiparamétrica intracelular. La Figura 1 muestra que los pacientes psoriásicos poseen una población de células T CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17A mayor (6,9% ± 1,7%) que la detectada en individuos control (0,9% ± 0,5%)

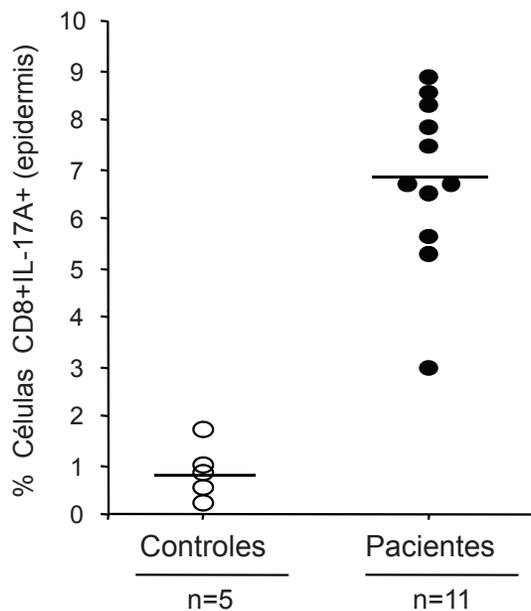


Figura 1.- Linfocitos T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>

### 1.1- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> PROCECENTES DE PIEL PSORIÁSICA Y PIEL SANA.

En nuestro estudio, los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, aislados de piel psoriásica (n=11) y piel sana (n=5) se seleccionaron en base a su expresión de CCR6 mediante inmunoselección magnética, resultando células T CD8<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> (que poseen un porcentaje de IL-17A mayor al 95%) y CD8<sup>+</sup>/CCR6<sup>-</sup> (no productoras de IL-17A) (Figura 2).

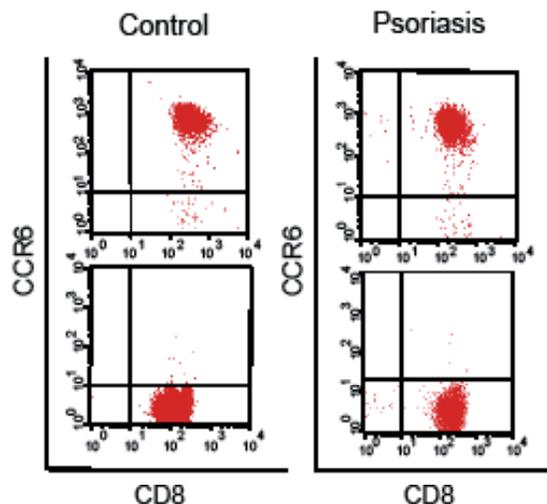


Figura 2.- Selección de la población CD8<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> de piel sana y piel psoriásica.

A continuación se ha estudiado el patrón de producción de citoquinas en cada una de las poblaciones T CD8<sup>+</sup>. Para ello las células se han estimulado con microesferas CD3/CD28 durante 4 días, y se ha determinado la presencia de IL-17A, IL-21, IL-22 (patrón de citoquinas característico de subpoblaciones Th17), TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (citoquinas producidas por células Th1) en los sobrenadantes celulares de dichas poblaciones. Los resultados muestran que los niveles de expresión de todas estas citoquinas están más elevados en células T CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> de enfermos psoriásicos (n=11) que en sus homólogos de individuos sanos (n=5) (Figura 3).

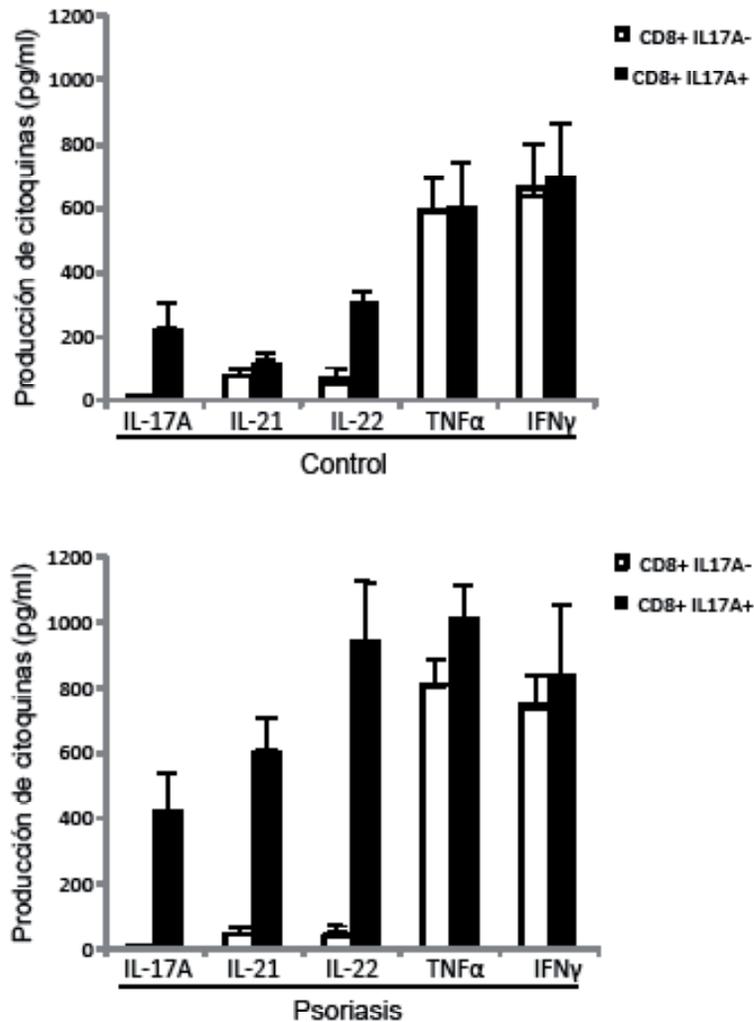


Figura 3.- Producción de citoquinas por células T de placa(pg/ml).

El estudio de la secreción de citoquinas IL-17A, IL-21, IL-22, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y TGF $\beta$  por parte de la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> se ha realizado por citometría de flujo intracelular multiparamétrica. Los resultados de los ensayos se reflejan en la Figura 4, donde se observa que las células productoras de IL-17A expresan IFN $\gamma$  en un 96%, y más concretamente, las células IL-17A<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> producen TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-21 e IL-22 en un porcentaje superior al 90%.

Por otro lado, las células T  $CD8^+/IL-17A^-$  expresan un 60% de  $IFN\gamma$ , un 95% de  $TNF\alpha$ , y ausencia de expresión para  $TGF\beta$ , IL-21 e IL-22.

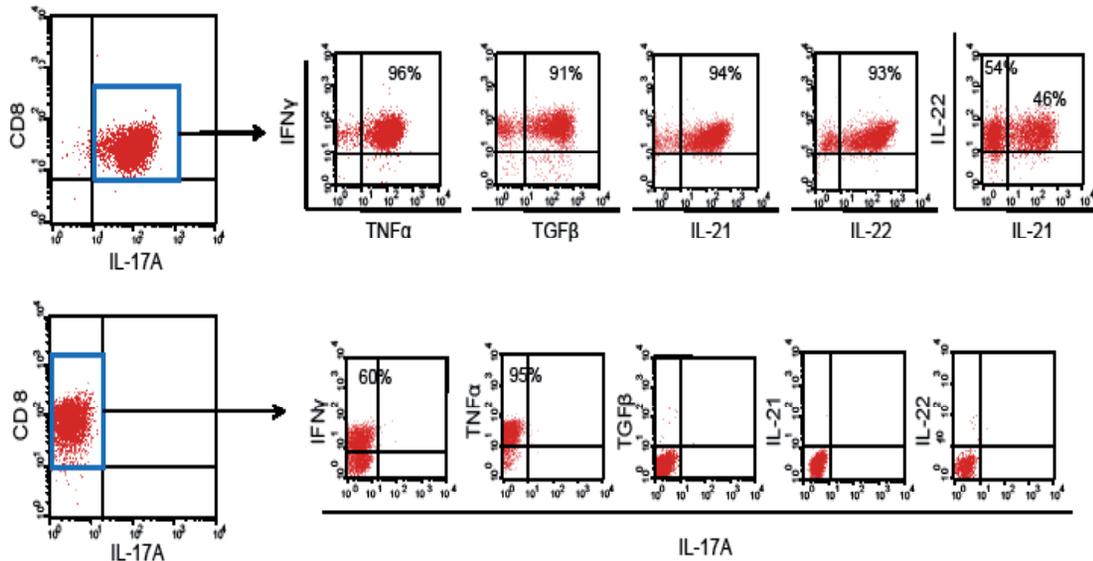


Figura 4.- Análisis de citoquinas intracelulares en poblaciones T  $CD8^+/IL17A^+$

Además se han realizado ensayos de inmunofluorescencia intracelular en células T  $CD8^+/IL17A^+$  psoriásicas para visualizar la coexpresión de IL-17A,  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$  mediante microscopía confocal. La observación directa de los linfocitos T  $CD8^+$  productores de IL-17A demuestra de manera clara la co-localización de IL-17 y  $TNF\alpha$ , así como de IL-17A e  $IFN\gamma$  (Figura 5).

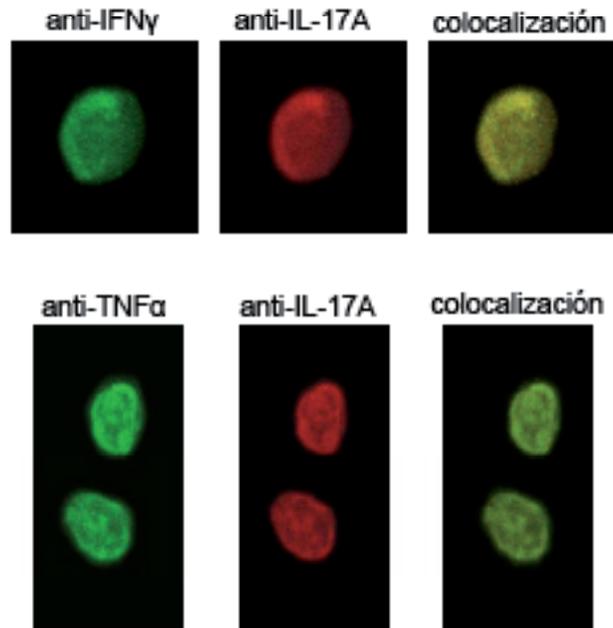


Figura 5.- Coexpresión de IL-17A con IFN $\gamma$  o TNF $\alpha$ .

### 1.2- FENOTIPO DE CÉLULAS T CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> DE PACIENTES CON PSORIASIS.

Una de las características que define a la subpoblación de linfocitos Th17 es la presencia en su superficie de moléculas conocidas [163]. Por este motivo se realiza un estudio fenotípico detallado de las células T CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17A aisladas de piel de enfermos psoriásicos. Ensayos de citometría de flujo multiparamétrica directa e indirecta evidencian que todos los linfocitos T estudiados presentan una expresión positiva del 100% para CD3, CD8 y TCR $\alpha\beta$ , y negativa para CD4 y TCR $\gamma\delta$  (Figura 6).

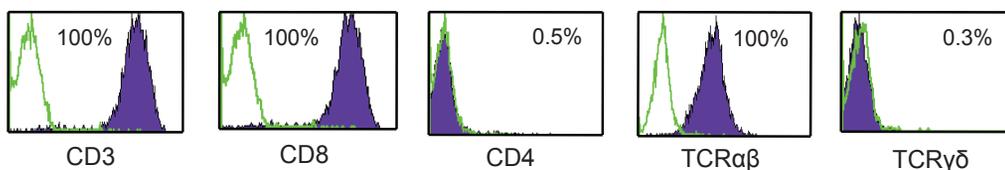


Figura 6.- Fenotipo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> aislados de piel psoriásica.

Los linfocitos T  $CD8^+/IL17A^+$  no son células Natural Killer (NK), ya que su expresión de CD56 y CD16 es  $\leq 0,5\%$ , mientras que las células T  $CD8^+$  no productoras de IL-17A son positivas para CD56 y CD16 en un 39% y 18% respectivamente (Figura 7).

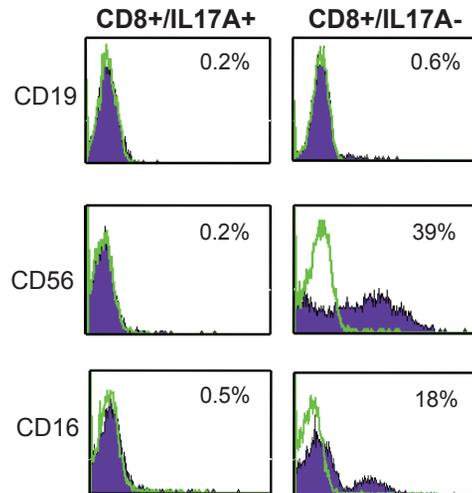


Figura 7.- Fenotipo parcial células T  $CD8^+$  aislados de piel psoriásica.

La Figura 8 muestra que la expresión de CD94 y NKG2D (molécula coestimuladora de linfocitos T  $CD8^+$  con actividad citotóxica) es negativa en células productoras de IL-17A, mientras que NKG2D se expresaba en un 29% en linfocitos T  $CD8^+/IL17A^-$ . En cambio, CD161, marcador característico de células productoras de IL-17A, se expresa en un 100% en linfocitos T  $CD8^+/IL-17A^+$ , y en un 0,1% en  $CD8^+/IL17A^-$ .

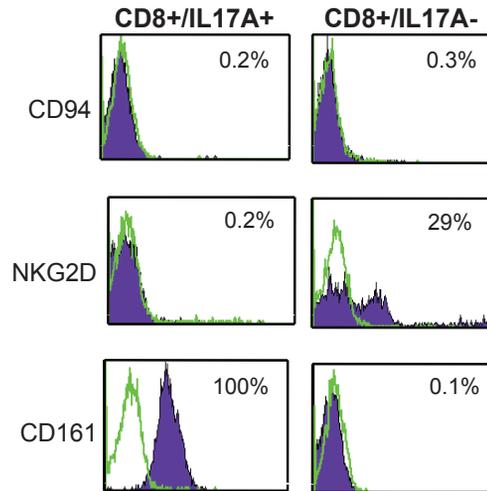


Figura 8.- Fenotipo parcial células T CD8<sup>+</sup> aislados de piel psoriásica.

Por otro lado, tanto células T CD8<sup>+</sup> productoras y no productoras de IL-17A de piel psoriásica presentan un fenotipo efector/memoria, expresando un 100% de CD45-RO y ausencia de expresión en CD45-RA. El marcador de superficie CD27 está ausente en ambas poblaciones celulares, en cambio, CD28 se expresa en un 95% únicamente en células T CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> (Figura 9).

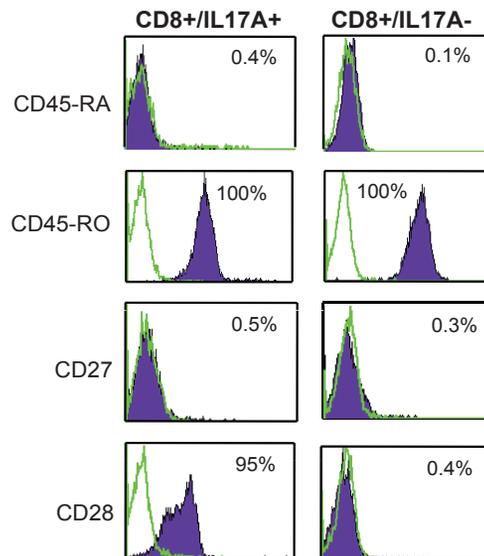


Figura 9.- Fenotipo efector/memoria de células T CD8<sup>+</sup> aislados de piel psoriásica .

Las dos poblaciones celulares están activadas, presentando ambas un porcentaje de expresión para CD25, CD69 y HLA-DR superior al 95% (Figura 10).

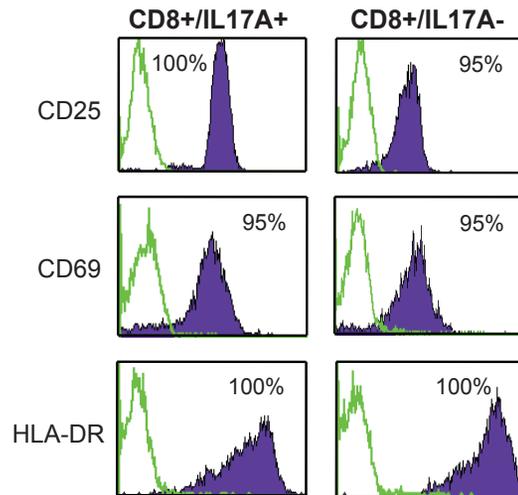


Figura 10.- Fenotipo activación células T CD8<sup>+</sup> de piel psoriásica.

También estudiamos la presencia de Perforina y gránulos de granzima A y granzima B en células T CD8<sup>+</sup> de piel psoriásica. La expresión de perforina se encuentra ausente en ambos tipos celulares estudiados, mientras que granzima A se expresa en un 68% en células productoras de IL-17A, y en un 65% en células no productoras de IL-17A. La expresión de granzima B (98%) se detecta solamente en linfocitos T CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>-</sup> (Figura 11).

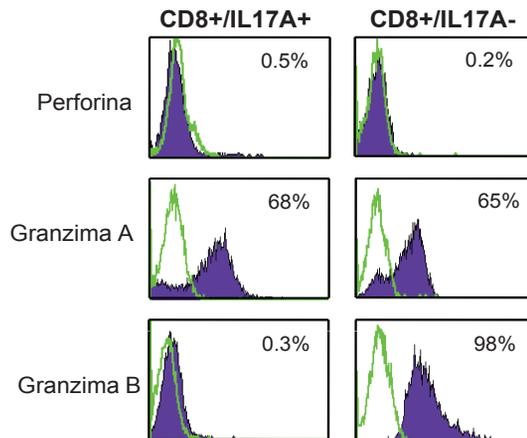


Figura 11.- Expresión de Perforina, granzima A y granzima B en células T CD8<sup>+</sup> psoriásicas

Se estudian tres receptores de quimioquinas en células T CD8<sup>+</sup> productoras y no productoras de IL-17A, CCR2, CCR5 y CCR6. La expresión de CCR2 en ambas poblaciones es negativa, pero CCR5 y CCR6 se expresan únicamente en células productoras de IL-17A, en un 98% y un 100% respectivamente. Por otro lado, la expresión del marcador CD103 (homing epidérmico) es de un 100% tanto en células productoras como no productoras de IL-17A (Figura 12).

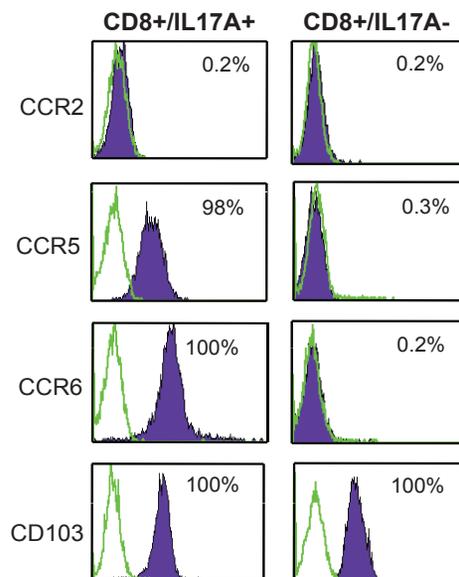


Figura 12.- Expresión receptores de quimioquinas y de homing epidérmico.

La expresión de Foxp3 es propia de células T reguladoras, mientras que la presencia de IL-23R es una característica importante en células Th17. Nuestros resultados demuestran que tanto células productoras como no productoras de IL-17A no expresan Foxp3. En cambio, la expresión de IL-23R es positiva en células T CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>-</sup> en un 98% y 32% respectivamente. (Figura 13).

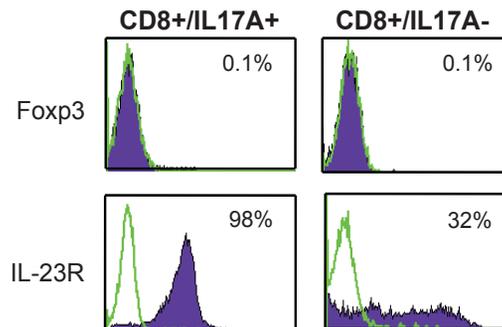


Figura 13.- Células T CD8<sup>+</sup> de piel psoriásica: marcadores de células T reguladoras.

Por último la Figura 14 muestra que la presencia del receptor de la cadena  $\alpha$  del IFN $\gamma$  (CD119) es positiva en linfocitos productores y no productores de IL17A, y la del receptor tipo 1 de TNF $\alpha$  (CD120a) es negativa en poblaciones celulares estudiadas.

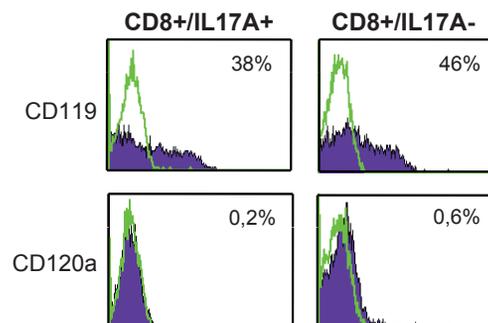


Figura 14.- Células T CD8<sup>+</sup> de piel psoriásica. Expresión de TNF $\alpha$ R y IFN $\gamma$ R.

### 1.3- REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE CÉLULAS T CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> DERIVADAS DE PLACAS PSORIÁSICAS.

RORC está definido como el factor de transcripción esencial para la síntesis y liberación de IL-17A por células Th17, mientras que T-bet es fundamental para desarrollar células Th1 a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes. Para determinar los factores de transcripción presentes en las células T productoras de IL-17A de piel psoriásica (n=8) hemos realizado estudios de PCR a tiempo real donde se cuantifica la expresión de los RORC, T-bet e IRF4. La Figura 15 muestra que los niveles de expresión tanto de RORC como IRF-4 están elevados en células T productoras de IL-17A (CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>) con respecto a la expresión de T-bet. En cambio en células T IL-17A<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>), los niveles de expresión de RORC e IRF4 no están incrementados, ya que estas células principalmente expresan T-bet.

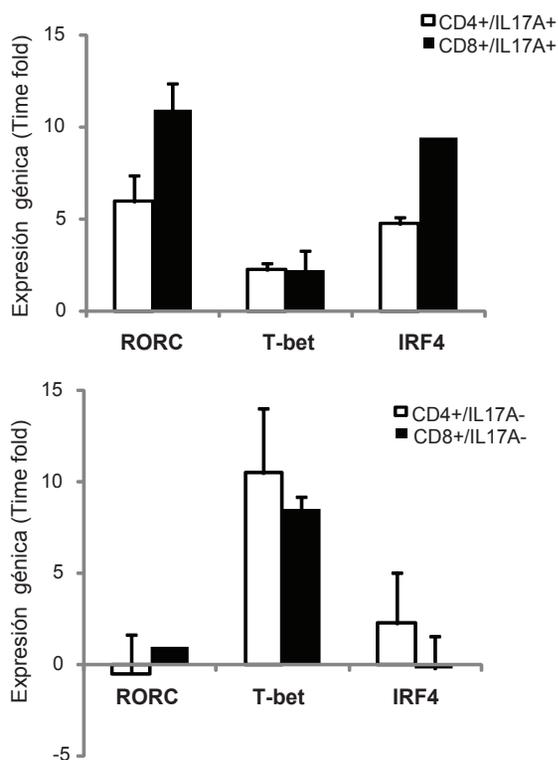


Figura 15.- Factores de transcripción RORC, T-bet e IRF4 en células T de placas psoriásicas.

La señal detectada en experimentos de PCR a tiempo real tiene relación con la presencia de la proteína RORC en interior del núcleo celular. Por este motivo realizamos ensayos de microscopía confocal, demostrando en ellos que RORC está presente en células IL-17A<sup>+</sup> (Figura 16).

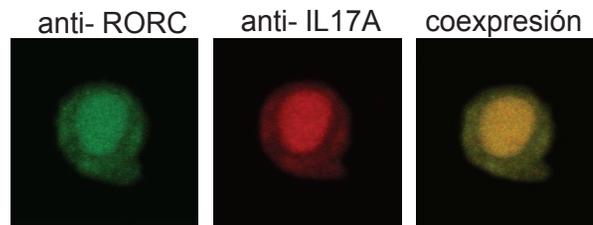


Figura 16.- Coexpresión de IL-17A y RORC en células T CD8<sup>+</sup> de piel psoriásica

También hemos comprobado por citometría de flujo multiparamétrica la expresión de los factores de transcripción RORC e IRF4 en células T CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>-</sup>. Las células IL-17A<sup>+</sup> muestran un porcentaje de expresión de un 98%, para RORC, y de un 92% para IRF4. En cambio, las células que no producen IL-17A carecen de la expresión de ambos factores de transcripción (Figura 17).

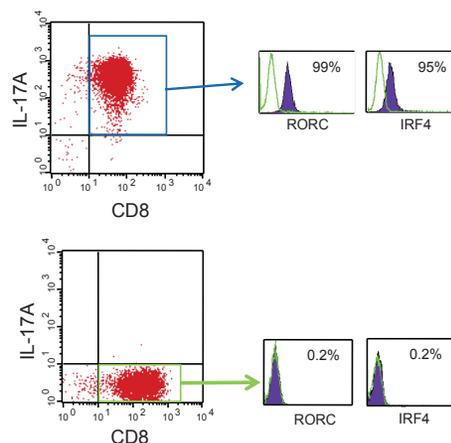


Figura 17.- Células T CD8<sup>+</sup> de piel psoriásica: expresión de RORC e IRF4

La regulación de la expresión de genes de células Th17 está fuertemente controlada por la IL-12, la cual disminuye la producción de IL-17A y aumenta la de IFN $\gamma$ . De tal manera que ensayos en los que se han estimulado células T CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> psoriásicas (n=9) con microesferas CD3/CD28 en presencia o ausencia de IL12 revelan que IL-12 inhibe en gran medida el número de células T CD8<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> que expresan IL-17A, IL-21 e IL-22, aumentando el de células productoras de IFN $\gamma$  y manteniendo el porcentaje de células productoras de TNF $\alpha$  inalterado (Figura 18).

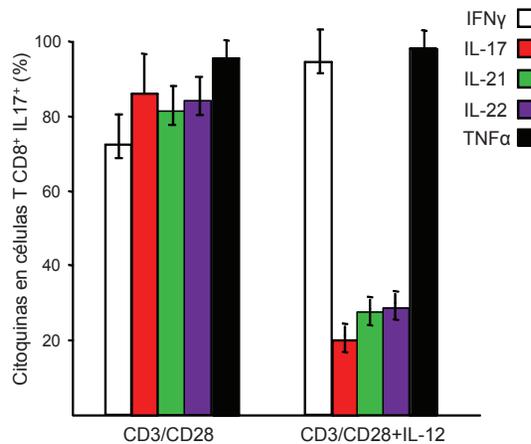


Figura 18.- Efecto de IL-12 en la producción de IL-17A e IFN $\gamma$ .

Además, el porcentaje de células CCR6<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> disminuye drásticamente en cultivos tratados con IL-12 (Figura 19).

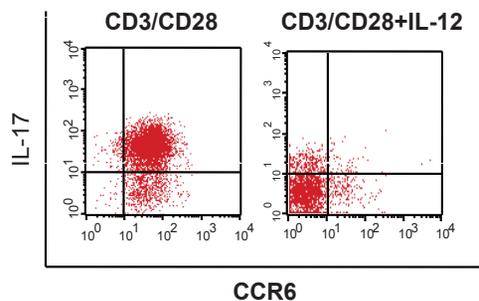


Figura 19.- Efecto de IL-12 en el número de células IL-17A<sup>+</sup>.

Experimentos de PCR a tiempo real en células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> (n=9) demuestran que la expresión del factor de transcripción RORC se reduce con la presencia de IL-12, mientras que los niveles de expresión de T-bet aumentan cuando la IL-12 se encuentra presente (Figura 20).

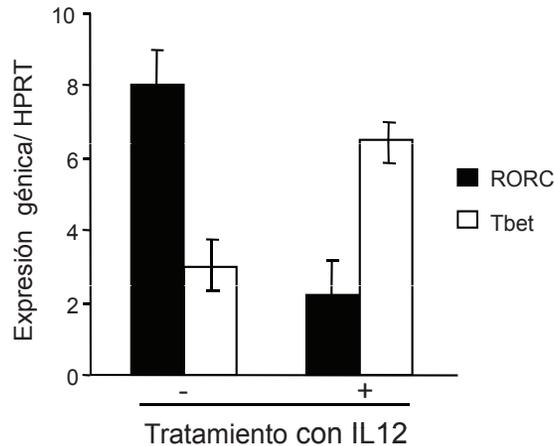


Figura 20.- Efecto de IL-12 en la expresión de RORC y T-bet.

### **1.3- ESTUDIO FUNCIONAL DE CÉLULAS T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> DERIVADAS DE PLACAS PSORIÁSICAS.**

Desde un punto de vista funcional, aún no está claro el papel que desempeñan las células T productoras de IL-17A en la enfermedad psoriásica. Por este motivo hemos determinado en primer lugar la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> obtenidas de biopsias de piel psoriásica (n=8) para proliferar en respuesta a una estimulación mediada por TCR. Para ello las células aisladas y expandidas según su expresión de CCR6 se han estimulado con microesferas CD3/CD28, solo o en presencia de IL-2, IL-12, IL-15, IL-23 ó TGFβ. Como control se ha utilizado una subpoblación Th17 bien caracterizada procedente de cordón umbilical. Los resultados indican que la respuesta de las células Th17 es muy similar a la producida por las células T CD8<sup>+</sup>/L-17A<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>-</sup> derivadas de piel psoriásica. Además, la proliferación de estos tres tipos

celulares en presencia de IL-2, IL-15 ó IL-12 está considerablemente aumentada en comparación con los resultados de proliferación obtenidos en ausencia de citoquinas exógenas. Por otro lado, la adición de TGF $\beta$  a los cultivos celulares no inhibe la proliferación de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>, mientras que si inhibe la de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>-</sup> de manera drástica, así como la de las células Th17 (Figura 21).

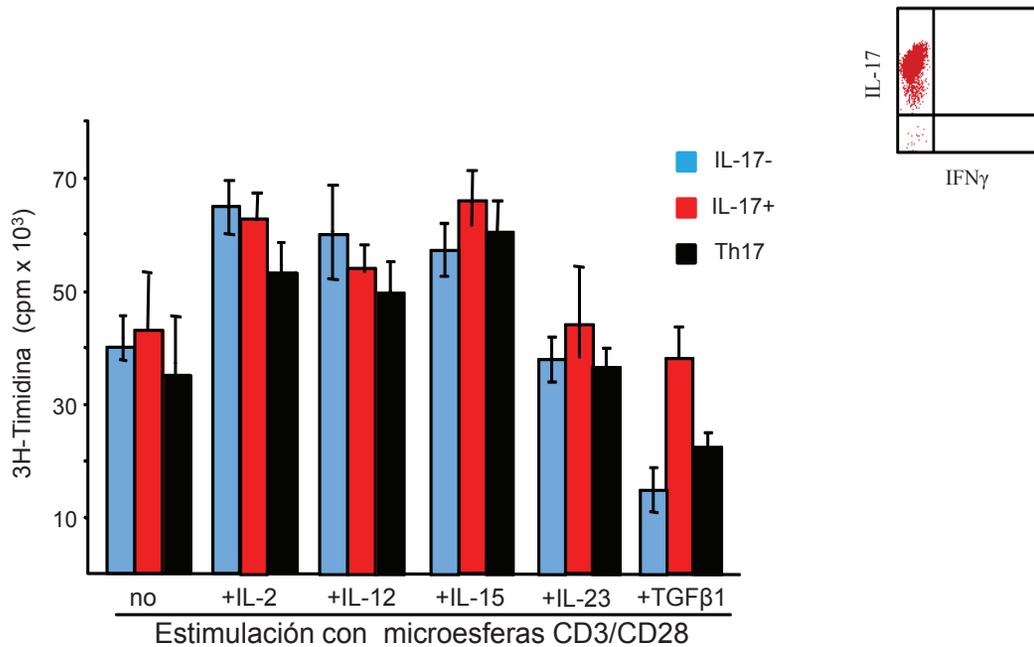


Figura 21.- Capacidad proliferativa de células de IL-17A<sup>+</sup>.

A la vista de estos resultados, estudiamos la posibilidad de que los linfocitos T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> derivados de pacientes psoriásicos fueran refractarios a la modulación funcional de las células T reguladoras. Por este motivo llevamos a cabo ensayos de inhibición de la proliferación para determinar la actividad reguladora de células Treg, aisladas de sangre periférica de individuos sanos, sobre linfocitos T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> derivados de enfermos psoriásicos. Los resultados muestran que esta población de células T CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17A es resistente a la modulación negativa de las células T reguladoras, mientras que la proliferación de la subpoblación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>-</sup> sí se inhibe de manera significativa (Figura 22).

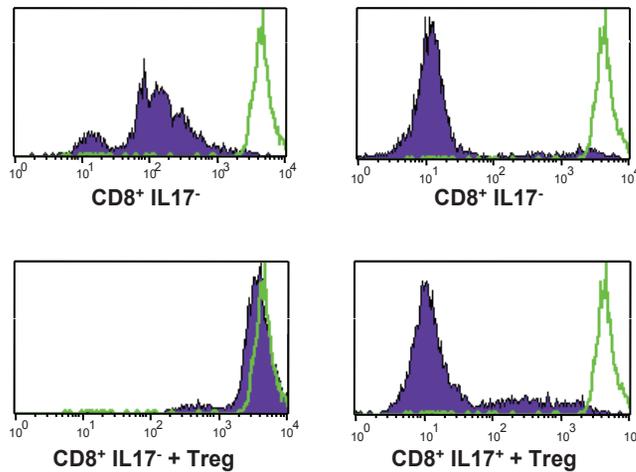


Figura 22.- Susceptibilidad de las células T  $CD8^+/IL-17A^+$  a células T reguladoras.

Seguidamente estudiamos si la concurrencia de citoquinas necesaria para los procesos de diferenciación de células Th17 podría influir en la producción del perfil de citoquinas de cada una de las subpoblaciones de células T aisladas de placas psoriásicas ( $CD8^+/IL-17A^+$  ó  $CD8^+/IL-17A^-$ ). Así pues, estas células T se estimulan con microesferas CD3/CD28 y se cultivan añadiendo al medio IL-1 $\beta$  e IL-6 (condiciones de polarización hacia Th17), además de en ausencia ó presencia de los anticuerpos monoclonales neutralizantes como anti-IFN $\gamma$ , anti-IL-4 y anti-IL-2. Tras 4 días de cultivo se determina el número de células que expresan IL-17A, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . La expresión de IL-17A en células  $CD8^+/IL17A^+$  (n=9) permanece sin cambios en todas las combinaciones usadas en el ensayo. El porcentaje de células T productoras de IFN $\gamma$  se ve ligeramente disminuido en los cultivos que contenían anti-IFN $\gamma$ , y el porcentaje de células T productoras de TNF $\alpha$  permanece inalterado en todas las combinaciones testadas. Así mismo, las células T  $CD8^+/IL-17A^-$  cultivadas en el ensayo en las mismas condiciones de polarización no tienen capacidad para inducir la producción de IL-17A (Figura 23).

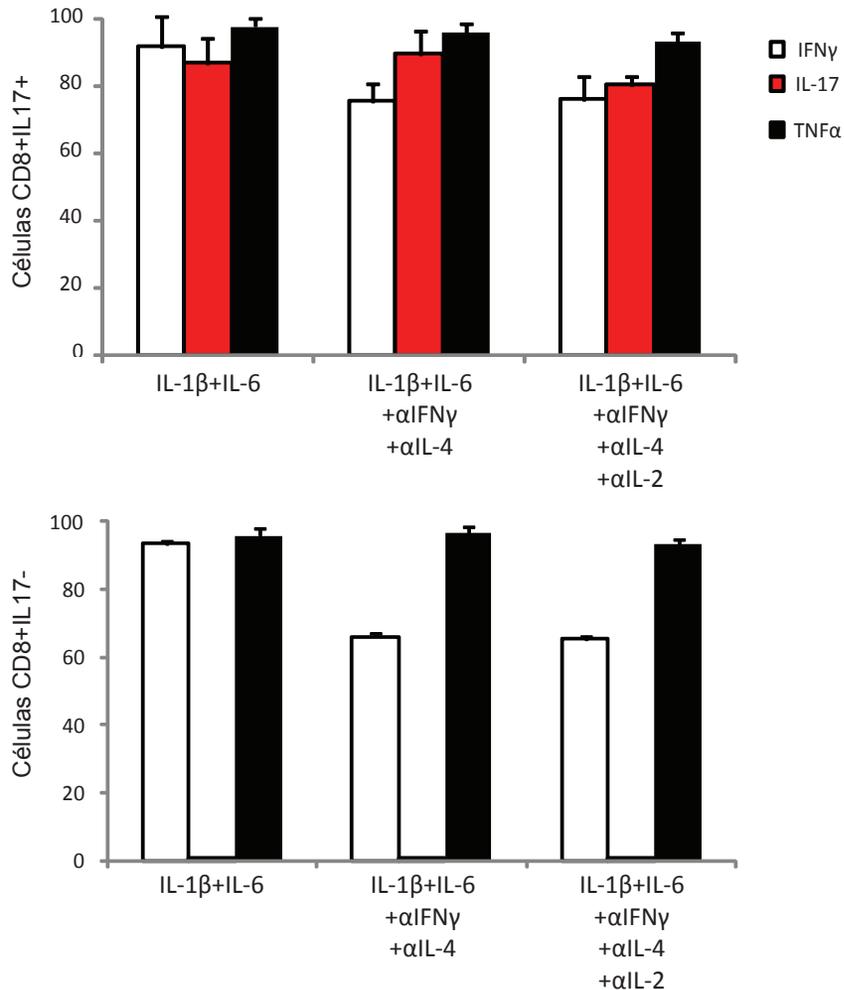


Figura 23.- La concurrencia de citoquinas necesaria para la diferenciación de células Th17 no inducen a la producción de IL-17A en células T CD8<sup>+</sup> no productoras de IL-17A.

Como hemos observado en el grupo de experimentos anterior, la producción de TNFα no se altera por ninguna de las combinaciones de citoquinas exógenas añadidas a los cultivos. Sin embargo, el tratamiento con anti-TNFα reduce significativamente la producción de IL-17A. Es interesante resaltar que el anticuerpo monoclonal anti-TNFα inhibe la expresión de CD69 (antígeno de activación temprana) entre un 60%-80% con

respecto a la expresión observada de este mismo marcador en células T psoriásicas en ausencia de anti-TNF $\alpha$ .

También se analizó el efecto neutralizante del anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> psoriásicos (n=9). Tanto las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> e IL-17A<sup>-</sup> reducen su expresión de CD69 (Canal medio de fluorescencia), la inhibición fue significativamente mayor en el grupo de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>, indicando que la activación de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> muestra una importante dependencia de la secreción autocrina de TNF $\alpha$ .

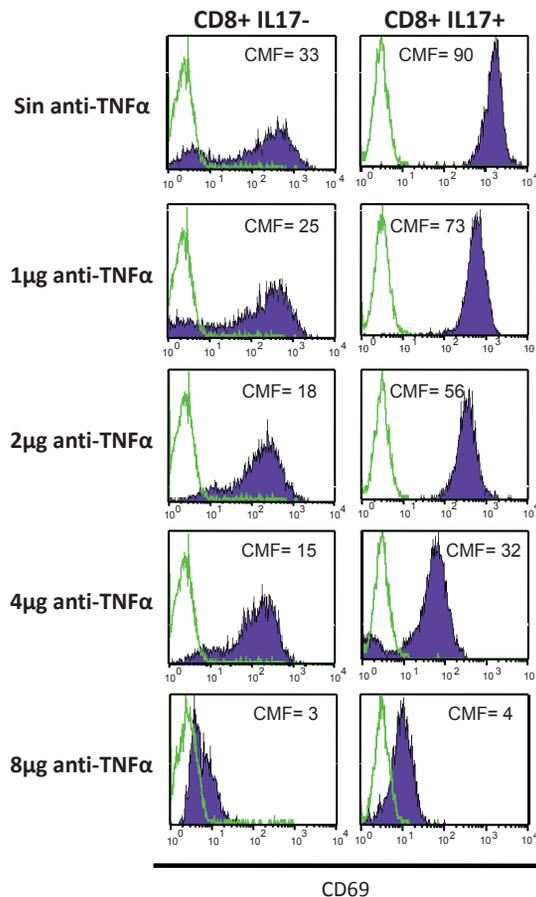


Figura 24.- Efecto del bloqueo de TNF $\alpha$  en la activación de células IL-17A<sup>+</sup>.

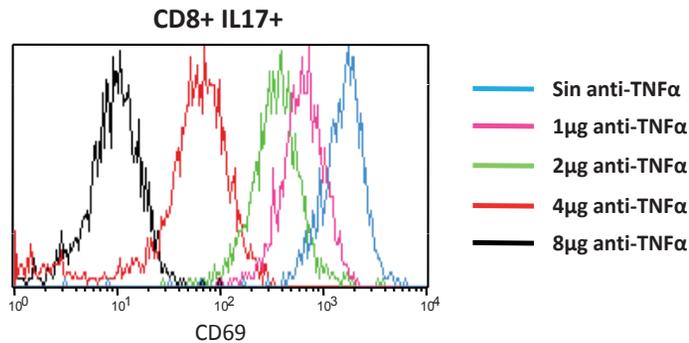


Figura 25.- Efecto del bloqueo de TNF $\alpha$  en la expresión de CD69 (overlay). Los datos corresponden con los mostrados en la Figura 24.

Finalmente se ha estudiado la capacidad citotóxica mediada por anti-CD3 (lisis redirigida) de las células T CD8<sup>+</sup> de la placa psoriásica. Para ello se ha utilizado el anticuerpo monoclonal anti-anexina V, que es un indicador temprano de apoptosis. Durante el proceso de muerte celular por apoptosis se produce una translocación de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática a la cara externa de la misma. La anexina V es una proteína que tiene elevada afinidad por la fosfatidilserina, y que se une a ella en el exterior de la célula. La expresión de anexina V se mide en la superficie de células diana P815 (mastocitoma murino) tras ser cocultivadas con las células efectoras (linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores y no productores de IL-17A de pacientes psoriásicos e individuos control) durante 4 horas, a los ratios Efectoras/Diana de 1:1, 10:1 y 40:1. Las células T CD8<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> muestran una capacidad citolítica significativamente mayor que las células CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>-</sup> (Figura 26).

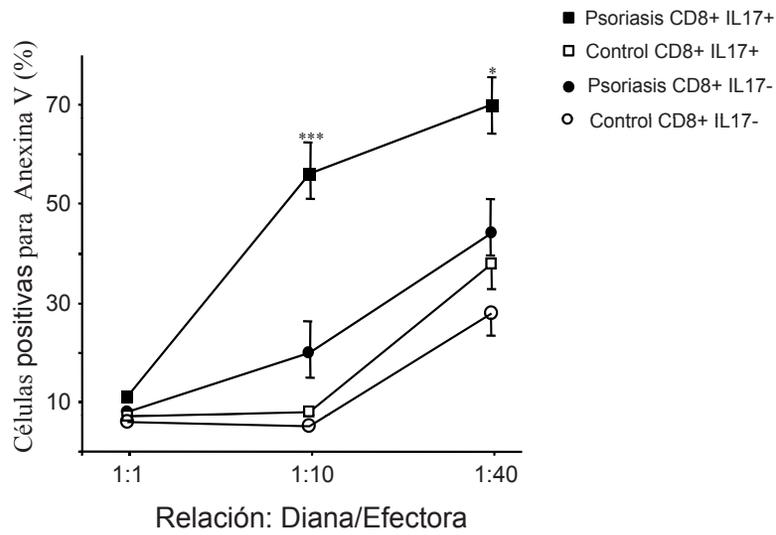


Figura 26.- Actividad citotóxica de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> psoriásicas.

## ***Enfermedad Celíaca***



## 2.1- AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup> PROCEDENTES DE DUODENO CELÍACO.

### 2.1.1.- Obtención de las células. Cultivo de las biopsias con gliadina.

Las células T obtenidas de biopsias de duodeno fueron estudiadas para determinar la presencia o ausencia de células productoras de IL-17A. Los resultados obtenidos en este análisis preliminar muestran que en pacientes celíacos no solo existe una población de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-17A sino que estas células están en mayor número ( $8.7\% \pm 2.4\%$ ), que en individuos sanos ( $3.6\% \pm 1.6\%$ ) ( Figura 27).

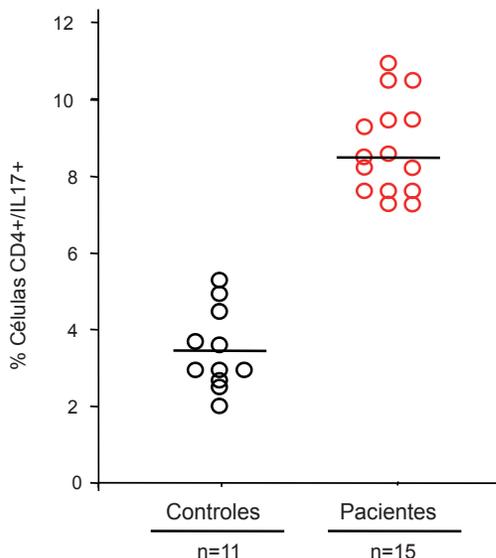


Figura 27.- Población T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> en pacientes celíacos.

Tras determinar que las células T CD4<sup>+</sup> aisladas de biopsias de duodeno producen IL-17A, linfocitos T CD4<sup>+</sup> de duodeno celíaco y control se seleccionaron en base a su expresión de CD4 y CCR6 mediante una inmunoselección magnética, obteniendo así células T CD4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> con una pureza que fue en todos los casos > 93% (IL-17A<sup>+</sup> >95%) (Figura 28).

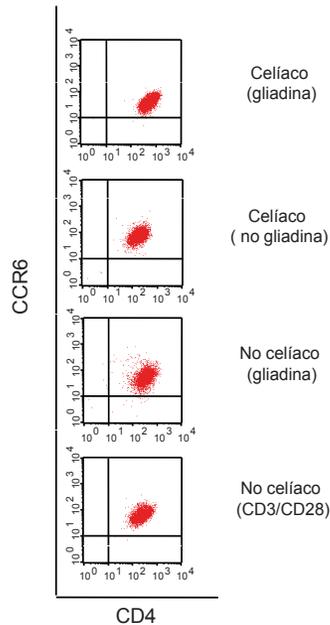


Figura 28.- Población T CD4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup>.

Las células T patogénicas procedentes de la mucosa de pacientes con enfermedad celíaca reconocen y responden a gliadina en el contexto de HLA-DQ2 ó DQ8 [164]. Así, estudiamos la especificidad y carácter patogénico de las células CD4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> resultantes del proceso de inmunoselección. Para ello, PBMCs irradiados de 4 donantes sanos diferentes HLA-DQ2<sup>+</sup> fueron cargados con diferentes concentraciones de péptidos de gliadina durante toda la noche y se cocultivaron con células CD4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> durante 5 días. Los resultados indican que las células T CD4<sup>+</sup> procedentes de pacientes celíacos (n=12) proliferan más en respuesta a la gliadina de una manera dosis-dependiente, mientras que de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los controles (n=7) no proliferaron. En contraste, la presentación de gliadina por células HLA-DQ2<sup>-</sup> no produce proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> tanto celíacas como no celíacas. Así mismo, la estimulación in vitro con transglutaminasa tisular no induce proliferación de células T apoyando de esta manera la especificidad de la respuesta a la gliadina observada en las células de pacientes celíacos (Figura 29).

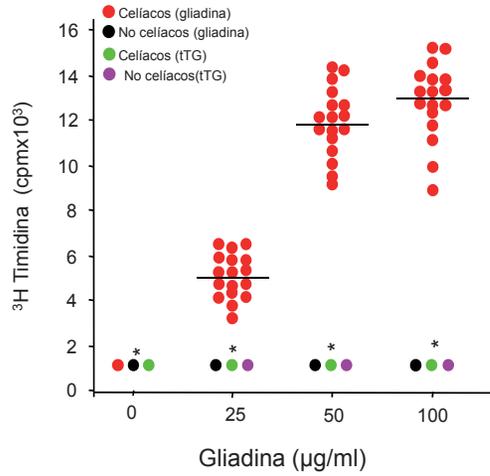


Figura 29.- Proliferación de células T CD4<sup>+</sup> en respuesta a gliadina.

A la vista de estos resultados, se inició la caracterización de la población CD4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> mediante el análisis de su firma de citoquinas en respuesta a gliadina y a través de PCRs cuantitativas. Se determinó la expresión de IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , IL-21, IL-22 e IL-17A. Los resultados de los ensayos, reflejados en la Figura 30 muestran que tras su estimulación con gliadina las células presentan niveles de expresión elevados de todas las citoquinas estudiadas. IL-22, IL-21 e IL-17A son las citoquinas estudiadas que alcanzan niveles de expresión más elevados, 9, 7.4 y 7 veces más que el gen constitutivo HPRT respectivamente, mientras que las citoquinas IFN $\gamma$  y TGF $\beta$  superan la expresión del gen de referencia en un 5.3 y 3.8 respectivamente.

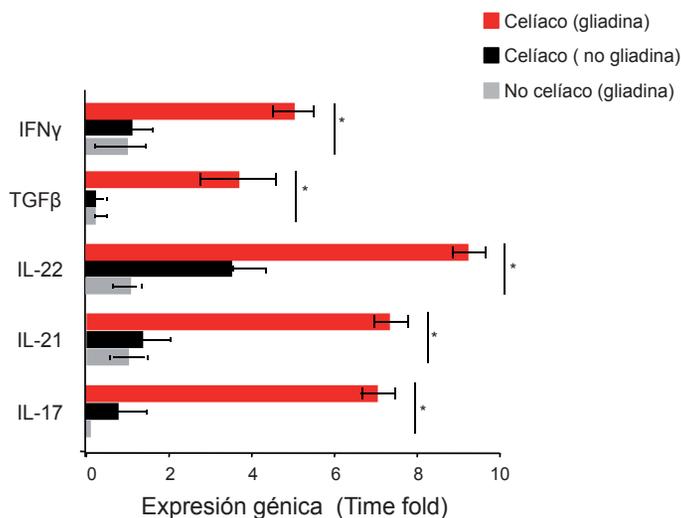


Figura 30.- Expresión génica de IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , IL-21, IL-22 e IL-17A en células T CD4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup>.

Para conocer si la firma de citoquinas detectada se traduce en la producción de las mismas y en su liberación al medio, se determinó la presencia de IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , IL-21, IL-22 e IL-17A de manera intracelular mediante citometría de flujo, así como en sobrenadantes de los cultivos celulares y en las mismas condiciones que para la determinación de la firma de citoquinas. Los resultados indican que de las poblaciones productoras de IL-17A celíacas estimuladas con gliadina producen y contienen TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-21, e IL-22 en más de un 94%, de las células. Ninguna de las poblaciones de células T produce IL-10 e IL-4 (Figura 31).

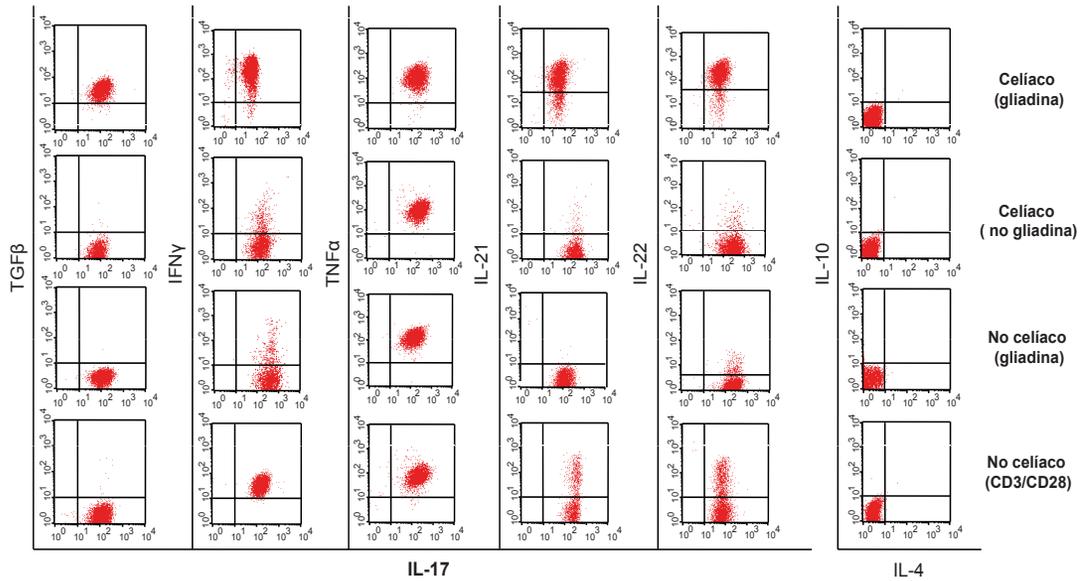


Figura 31.- Análisis de citoquinas intracelulares en poblaciones  $T$   $CD4^+/CCR6^+$ .

Asimismo pudo constatar la presencia de todas las citoquinas estudiadas en los sobrenadantes celulares, indicando claramente que la expresión de las citoquinas relacionadas con Th17, pueden jugar un papel relevante en la patogenia y la respuesta anti-gliadina en la celiacía. En la Figura 32 se muestra la producción de todas las citoquinas indicadas en células  $T$   $CD4^+/CCR6^+$  y  $CD4^+/CCR6^-$ , observándose que la producción de  $TGF\beta$ , IL-21, IL-22 e IL-17A en células  $CCR6^+$  de enfermos celíacos estimuladas con gliadina esta incrementada respecto a la de individuos no celíacos. Por otro lado, en la fracción celular  $CCR6^-$  no se observa producción de  $TGF\beta$  e IL17A. IL-21 e IL-22 alcanzan uno niveles de producción más elevados en células de individuos celíacos estimuladas con gliadina, siendo estos a su vez más reducidos que los detectados en células  $CCR6^+$ . En cambio, la producción de  $IFN\gamma$  en células  $CCR6^+$  y  $CCR6^-$  es muy similar, siendo en ambos casos más elevada en células de individuos no celíacos estimuladas con microesferas CD3/CD28 que en células de pacientes celíacos estimuladas con gliadina.

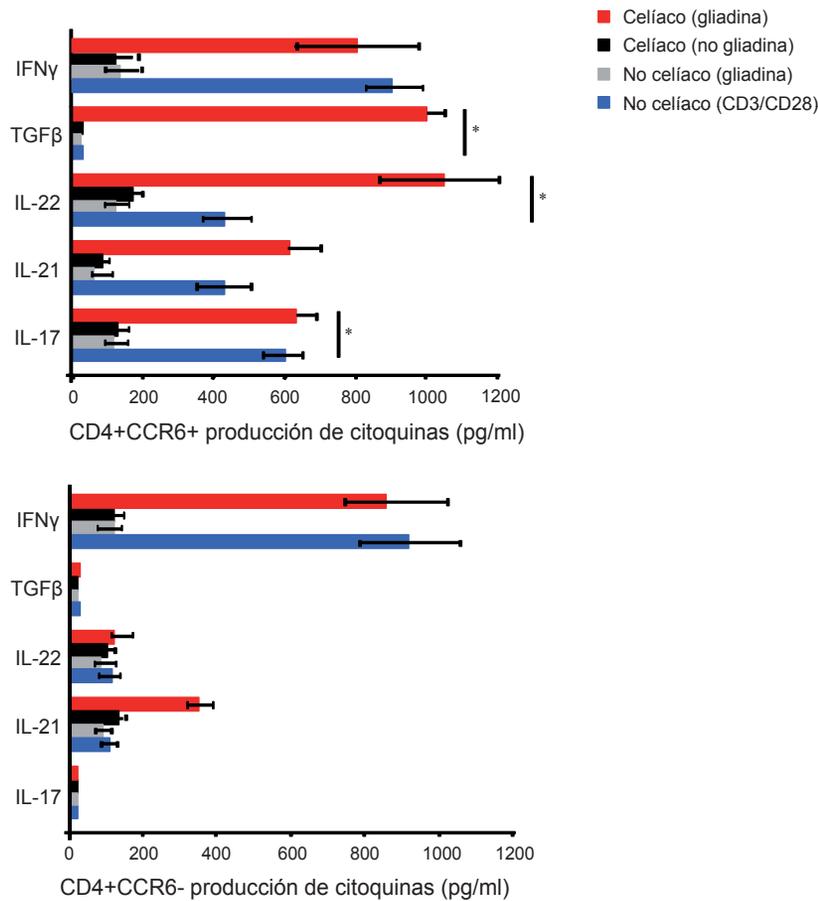


Figura 32.- Producción de citoquinas por células T  $CD4^+/CCR6^+$ .

Los linfocitos Th17 poseen características fenotípicas bien definidas, principalmente referentes a la expresión de receptores de quimioquinas e interleuquinas, así como algunos marcadores propiamente implicados en procesos de homing en diferentes órganos y tejidos. La caracterización fenotípica de nuestras células productoras de IL-17A muestra que en todos los casos estudiados las células productoras de IL-17A de duodeno celiaco son linfocitos  $CD4^+$  expresando un receptor para el antígeno  $TCR\alpha\beta^+$  (Figura 33).

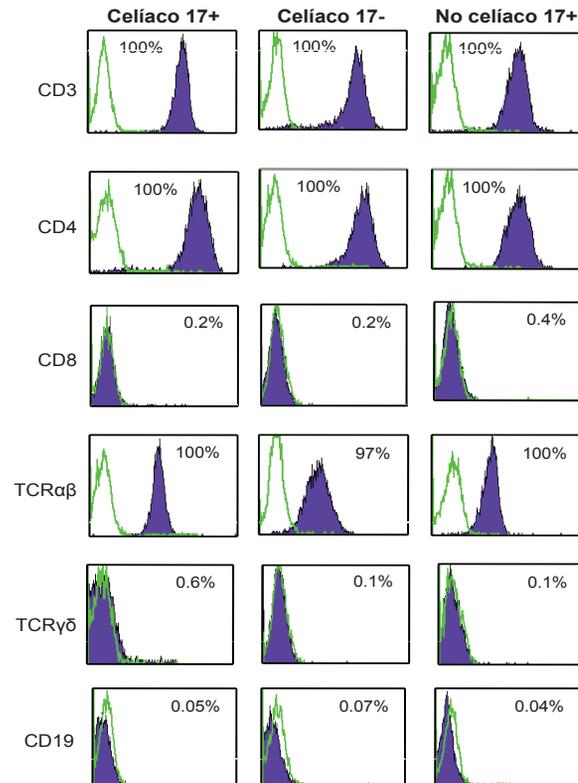


Figura 33.- Fenotipo de células T IL-17A<sup>+</sup>.

Las células de la población CD4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> presentan un fenotipo efector/memoria activado (Figura 34).

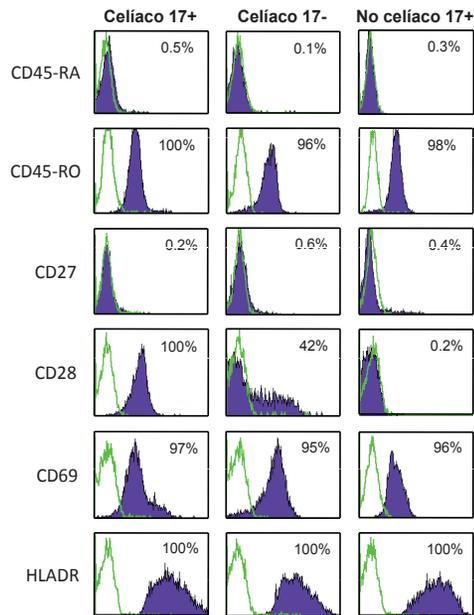


Figura 34.- Fenotipo efector/memoria activado de células T  $CD4^+/CCR6^+$ .

Se ha sugerido que las células productoras de IL-17A proceden de un precursor común cuya característica es la expresión de CD161. En nuestras poblaciones observamos una expresión variable de CD161 en los diferentes pacientes y controles, alcanzando un valor máximo del 76% en células T  $CD4^+/IL-17A^+$  aisladas de enfermos celíacos. Sus homólogas en individuos no celíacos expresan un 41% de CD161, mientras que las células no productoras de IL-17A alcanzaron a expresarlo en un 14% (Figura 35).

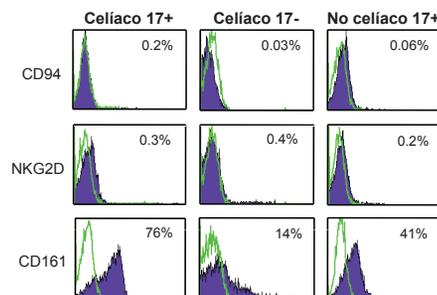


Figura 35.- Expresión de CD161 en células T  $CD4^+/CCR6^+$ .

El análisis de la expresión de receptores de quimioquinas muestra que la expresión selectiva de CCR5 se encuentra hasta en un 98% en células IL-17A<sup>+</sup> de duodeno celíaco, y la de CCR6 ha sido detectada en células IL-17A<sup>+</sup> de individuos celíacos y no celíacos en un 100% y 80%, respectivamente (Figura 36).

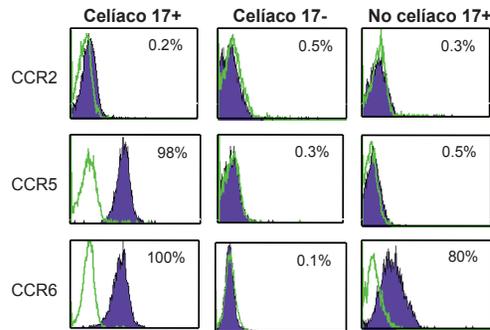


Figura 36.- Expresión de receptores de quimioquinas en células T CD4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup>.

Un aspecto de interés fenotípico es la posibilidad de discriminar si las células IL-17A<sup>+</sup> están en un estadio final de su diferenciación o en un estado de transición entre células T reguladoras y Th17 [165]. Nuestros resultados indican que no se trata de células en transición, a la vista de la ausencia de expresión del factor de transcripción Foxp3, característico de células T reguladoras. Por el contrario, el receptor de IL-23 (IL-23R) se encontró en la práctica totalidad de las células IL-17A<sup>+</sup> celíacas (un 96%) y en linfocitos IL-17A<sup>+</sup> de individuos no celíacos (un 86%) (Figura 37).

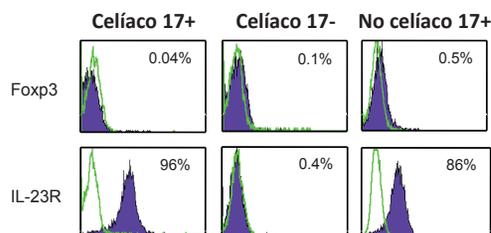


Figura 37.- Expresión de fenotipo T regulador en células T CD4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup>.

La Figura 38 muestra la expresión de los receptor del IFN $\gamma$  (CD119) y de TNF $\alpha$  (CD120a) en células T CD4<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> de pacientes celíacos.

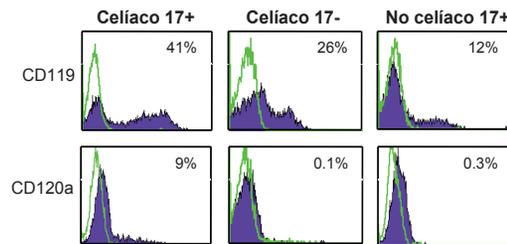


Figura 38.- . Expresión de TNF $\alpha$ R y IFN $\gamma$ R en células T CD4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> .

## 2.2.- REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE CÉLULAS T CD4<sup>+</sup> IL17A<sup>+</sup> DERIVADAS DE BIOPSIAS DE DUODENO CELÍACO.

La caracterización de las células T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> gliadina-específicas de pacientes con celiacía se extiende hasta el análisis de su patrón transcripcional, por cuanto es conocido que la producción de IL-17A es regulada transcripcionalmente por RORC. La cuantificación del ARN mensajero (ARNm) derivado de células estimuladas con gliadina muestra un aumento de los niveles de expresión de los genes RORC, T-bet e IRF4 en células Th17 de biopsias celíacas y células Th17 control. Las células Th17 derivadas de enfermos celíacos en ausencia de gliadina también expresan ARNm de RORC pero en menor medida que las estimuladas con gliadina. De manera muy interesante, encontramos una elevada expresión del factor de transcripción IRF4 en células Th17 gliadina-específicas de biopsias celíacas, mientras que no se encontraron aumentados en los controles o en la fracción de células T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> de los pacientes celíacos. (Figura 39).

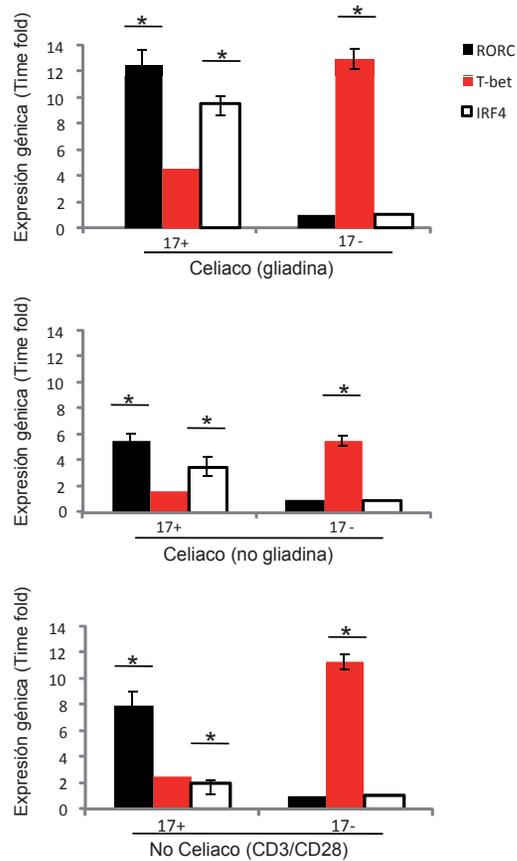


Figura 39.- RORC, T-bet e IRF4 en células T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>.

La presencia de los factores de transcripción RORC e IRF4 se han confirmado a nivel de proteína mediante citometría de flujo intracelular. Los resultados que se muestra la Figura 40, confirman que la expresión de RORC e IRF4 está presente en células IL-17A<sup>+</sup> de enfermos celíacos, mientras que se encuentran ausentes en células IL-17A<sup>-</sup>.

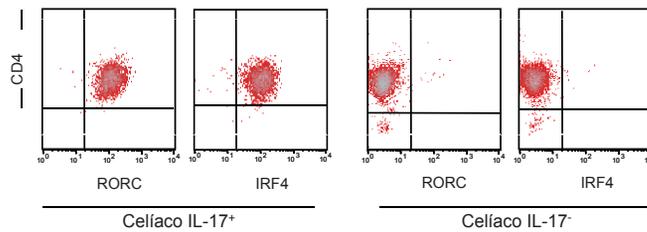


Figura 40.- Análisis intracelular por citometría de flujo de RORC e IRF4 en enfermos celíacos.

### 2.3.- ACTIVIDAD FUNCIONAL DEL TGF $\beta$ PRODUCIDO POR LAS CÉLULAS T CD4<sup>+</sup> IL17A<sup>+</sup> DE PACIENTES CON ENFERMEDAD CELÍACA.

Como hemos mostrado en ensayos anteriores, las células Th17<sup>+</sup> aisladas de biopsias de duodeno celíaco producen elevadas cantidades de TGF $\beta$ . El papel funcional del TGF $\beta$  en la población celular Th17<sup>+</sup> no es conocido. Por ello se llevaron a cabo dos grupos diferentes de experimentos: Por una parte se observó el efecto de la adición de TGF $\beta$  exógeno en la población productora de IL-17A y por otra parte se estudió el efecto que el bloqueo del TGF $\beta$ , tanto exógeno como endógeno, ejerce sobre dicha población celular. Así pues, las células Th17<sup>+</sup> se cultivaron durante 16 horas en presencia o ausencia de TGF $\beta$  exógeno (5 ng/ml). Los resultados obtenidos demuestran que la adición del TGF $\beta$  regula positivamente la producción de IL-17A, como evidencia el importante cambio observado en el canal medio de fluorescencia (CMF) cuando las células son marcadas con anticuerpos anti-IL-17A (CMF 23 hasta CMF 246 en la población tratada con TGF $\beta$ ) (Figura 41).

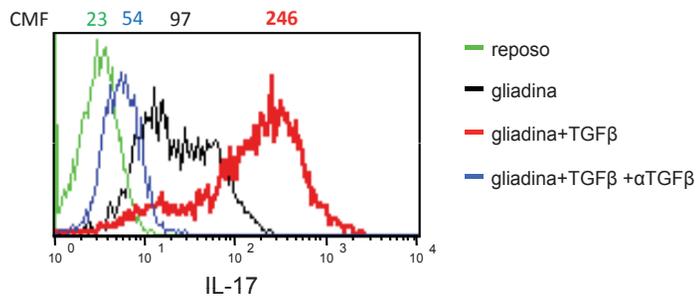


Figura 41.- Regulación por TGF $\beta$  de IL-17A en células Th17 de duodeno celíaco.

Esta acción es mediada por IRF4 y RORC cuya expresión esta significativamente elevada en presencia de TGF $\beta$  (Figura 42).

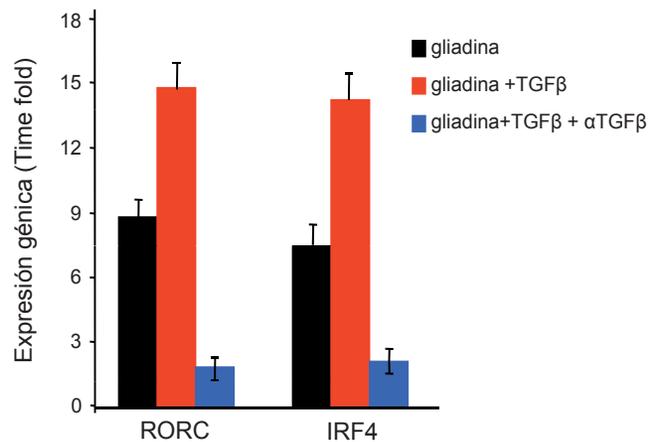


Figura 42.- La regulación de IL-17A por TGF $\beta$  es dependiente de RORC e IRF4.

Por último, la producción y liberación de IL-17A, cuantificada en los sobrenadantes de los cultivos, es inhibida en presencia de anti-TGF $\beta$ , demostrando de esta manera que el TGF $\beta$  producido por células T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> celíacas es biológicamente activo y puede desempeñar un papel relevante en la patogenia de la enfermedad participando en la regulación de la producción de IL-17A. (Figura 43).

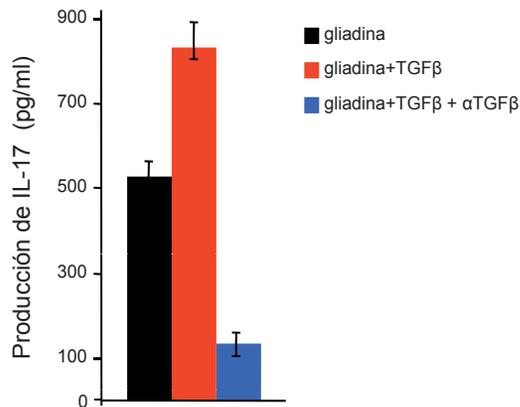


Figura 43.- Regulación positiva de la producción de IL-17A por TGF $\beta$ .

# **Discusión**



En este estudio hemos caracterizado linfocitos T CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> presentes en lesiones dérmicas de pacientes psoriásicos (placa psoriásica). Hemos observado que la paca psoriásica contiene células T CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17A en una proporción significativamente mayor que la existente en la piel de individuos sanos, como se ha sugerido previamente [116].

Estas células comparten con la población Th17 características fenotípicas propias, como la expresión de CCR6 e IL-23R. También expresan la integrina  $\alpha E\beta 7$  (CD103). Esta molécula está presente en linfocitos intraepiteliales del intestino, el pulmón y la piel entre otros, además de en células dendríticas y células T reguladoras [166, 167]. Las integrinas son moléculas de adhesión transmembrana que median el acoplamiento entre células adyacentes o entre células y la matriz extracelular [166]. La expresión de CD103 parece ser un requisito para el homing epidérmico de todas las células CD8<sup>+</sup> [168], dado que la presencia en la piel de  $\alpha E\beta 7$  es importante no solo por la retención de linfocitos sino también por su movimiento y migración dentro del epitelio [166].

Todas las células T aisladas de placas psoriásicas poseen un receptor antigénico de tipo  $\alpha\beta$  (TCR  $\alpha\beta$ ). No hemos encontrado otro tipo de células productoras de IL-17A, como células NKT invariantes [169] o células T TCR $\gamma\delta$  [170], lo que sugiere que estas poblaciones no están implicadas en la lesión, o en otros términos, que estas poblaciones pueden no ser relevantes en la patogénesis de la psoriasis, al menos en lo referente a la producción de IL-17A.

El patrón de factores de transcripción encontrado en células T CD8<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> es comparable con el descrito previamente en células Th17 [7, 8], indicando que la maquinaria transcripcional y de control responsable de la expresión del gen de IL-17A está conservada a través de toda la diferenciación del linaje de linfocitos T. En este sentido, nuestros datos sugieren que las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> se asemejan a las células Th17, mientras que las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>-</sup> serían similares a las células Th1.

Sin embargo, una rasgo característico de las células  $CD8^+/IL-17A^+$  que no se halla en células Th17 es la expresión del factor de transcripción T-bet. Nosotros pensamos que es poco probable que esta expresión diferencial pudiera deberse a una pequeña contaminación de células T  $CD8^+/IL-17A^-$  en nuestra población celular, en la que más del 98% de células  $CD8^+/IL-17A^+$  analizadas, expresan además CCR6, un marcador selectivo de células productoras de IL-17A.

De manera interesante, en presencia de IL-12 exógena, las células  $CD8^+/IL-17A^+$  regulan positivamente la expresión del gen T-bet a la vez que sufren una reducción significativa del número de células productoras de IL-17A, tal y como ocurre con células Th17 [8]. Este hallazgo refuerza la idea de que los mecanismos reguladores del gen de IL-17A son similares en células T  $CD8^+/IL-17A^+$  y Th17.

Destacablemente, no hemos encontrado células  $CD8^+$  que produzcan exclusivamente IL-17A, en tanto que la mayoría producen además  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$ . Esto es una diferencia significativa con las células Th17, que no producen ni  $TNF\alpha$  ni  $IFN\gamma$ . En la población  $CD8^+/IL-17A^+$  encontramos coexpresión de las tres citoquinas en la mayoría de las células, indicando que la producción de citoquinas por esta población celular es activamente redundante con la de células  $CD4^+$  presentes en la placa psoriásica, reforzando así su relevancia biológica en la patogénesis de la enfermedad.

Sin embargo, las células T  $CD8^+/IL-17A^+$  aisladas de epidermis de individuos sanos también sintetizan las tres citoquinas tras estimularlas vía TCR, apoyando la idea de que este hecho es un atributo fisiológico más que una alteración específica de la psoriasis. Así pues, es concebible que los linfocitos T  $CD8^+/IL-17A^+$  sean células T residentes o huéspedes polarizadas “in situ” a la producción de IL-17A, más que “linfocitos T infiltrados”. Esta posibilidad suscita cuestiones interesantes, aún no aclaradas, como la del lugar donde se generan las células productoras de IL-17A presentes en la lesión psoriásica, o cómo estas células adquieren la capacidad para cambiar su fenotipo dependiendo de la citoquinas presentes en el medio en el lugar de la inflamación.

Consecuentemente estudiamos la posibilidad de que las células CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>-</sup> derivadas de lesiones de piel psoriásica pudieran derivar a células CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> y viceversa, es decir si células CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> pudieran ser reguladas negativamente (inhibidas) en respuesta a diferentes condiciones de polarización. Hemos observado que la subpoblación CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>-</sup> es estable independientemente del tratamiento recibido. Sin embargo IL-12 induce la reducción de la IL-17A, producida por células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>, a la vez que aumenta la de IFN $\gamma$  en concordancia con observaciones previas [8], Así mismo, IL-12 aumenta la proliferación de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> en respuesta a una estimulación mediada por CD3-TCR.

El hecho de que el número de células productoras de TNF $\alpha$  permanezca inalterable apoya la idea de que TNF $\alpha$  lidera algún tipo de jerarquía de citoquinas en el desarrollo de la psoriasis [171, 172]. Esta idea se ve reforzada por la observación de que el bloqueo del TNF $\alpha$  endógeno obstaculiza por completo la activación y producción de IL-17A por parte de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> en respuesta a la estimulación mediada por CD3-TCR. Los resultados sugieren una interrelación compleja entre citoquinas en el mantenimiento de células CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>, las cuales parecen depender de la ausencia de IL-12 y de la presencia simultánea de al menos TNF $\alpha$ .

Es probable que las células productoras de IL-17A se generen en otros lugares pero produzcan IL-17A únicamente cuando se localizan en zonas donde existe una inflamación activa, conteniendo estas zonas citoquinas relevantes para la inducción de la producción de IL-17A, y careciendo de citoquinas inhibitorias de IL-17A, como es el caso de la IL-12.

De acuerdo con este modelo, la producción de IL-17A podría ser el resultado de un desequilibrio local del entorno de citoquinas. Recientemente se ha propuesto que las células IL17A<sup>+</sup> migran a la piel a través del ligando de CCR6, CCL20, una molécula secretada por células dendríticas mieloides. El mismo estudio sugiere también que IFN $\gamma$  induce a las células dendríticas mieloides a producir IL-1 e IL-23, las cuales producirían a su vez IL-17A [116]. Sin embargo, este modelo no explica el hecho de que no todas las

células T presentes en la placa psoriásica son IL-17A<sup>+</sup> o el origen de las células IL-17A<sup>+</sup>, por ejemplo, si las células productoras de IL-17A son generadas in situ tras la interacción con células dendríticas mieloides polarizadoras de Th17/Th1 que es conocido que se acumulan en la piel psoriásica [120] o entran en la piel ya como células productoras de IL-17A, tras su activación en ganglios linfáticos próximos o lejanos.

En lo referente a la contribución de las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> epidérmicas a la patogénesis de la enfermedad, hemos probado que las células CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> proliferan y secretan citoquinas de manera eficiente en respuesta a la estimulación mediada por CD3/TCR y a ciertas citoquinas [67, 173]. El aumento de la respuesta proliferativa obtenida en presencia de IL-12 o IL-15 demuestra claramente que no hay células anérgicas o tolerizadas en nuestra población.

De manera interesante, las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> muestran baja susceptibilidad a la acción de células T reguladoras de sangre periférica. Se ha descrito previamente que las células Th17 humanas son menos sensibles a Treg que las células Th1 [8], y más recientemente se ha descrito en modelos murinos de una enfermedad autoinmune (síndrome de ojo seco o dry eye) la resistencia de las células Th17 a la supresión por células Treg [174].

Es destacable que en nuestros experimentos, TGFβ no inhiba la proliferación de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>, mientras que reduce significativamente la de las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>-</sup>. Esto indica un posible mecanismo de las células CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> para escapar del control de las células Treg o alternativamente, un papel dual para este factor dependiendo de la subpoblación de células T sobre las que ejerce su acción [38, 45]. Sin embargo debe considerarse la posibilidad de que el resultado en presencia de células T reguladoras antígeno-específicas puede ser diferente. En este sentido hay que resaltar que en nuestros experimentos, TGFβ no inhibe la proliferación de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>, mientras que la proliferación de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>-</sup> fue inhibida de manera significativa. Este hecho indica la existencia de un posible mecanismo de las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> para escapar del control de las células T reguladoras

o alternativamente, un papel dual para este factor dependiendo de la subpoblación de células diana [38, 45].

Finalmente, la posibilidad de que las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> pudieran reaccionar en menor medida a células T reguladoras en cocultivo también merece ser considerada, así como que proliferen mucho más rápido que las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>-</sup>. Si esta fuera la causa de su resistencia a células T reguladoras apoyaría la idea de que en una población de las estudiadas, el número de células (o ratio) que proliferan en el momento del contacto con células Treg sería un factor crítico para lograr una supresión eficiente.

La presencia en la epidermis psoriásica de linfocitos T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> con actividad citotóxica, como hemos demostrado en este estudio, puede sugerir un papel fisiológico de las mismas en el control fisiológico del crecimiento de queratinocitos. La capacidad de las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> derivadas de placas psoriásicas para destruir las células diana de manera CD3/TCR dependiente sugiere que esta actividad en la epidermis psoriásica podría promover la destrucción del tejido local para limitar el crecimiento de los queratinocitos. Esto podría implicar el reconocimiento mediado por TCR/CD3 de antígenos previamente ocultos o la destrucción de queratinocitos que sufren una diferenciación anómala durante el proceso de crecimiento por estrés que se produce en la psoriasis activa.

La marcada capacidad citotóxica de las células CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> podría recordar al mecanismo responsable de la destrucción de células epiteliales en la mucosa del intestino delgado de pacientes con enfermedad celíaca sometidos a estimulación crónica de sus células T CD4<sup>+</sup> de la lámina propia con péptidos del gluten [153, 175, 176]. Estos mecanismos requieren la expresión coordinada en células T CD8<sup>+</sup> con NKG2C y NKG2D en respuesta a IL-15.

Las células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> responden de manera eficiente a IL-15, que interesadamente es producida también por queratinocitos psoriásicos [177, 178], pero un mecanismo citotóxico similar puede excluirse, en tanto que las células psoriásicas CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> carecen de la expresión de NKG2C y NKG2D. También hemos contemplado la posibilidad de que nuestras células CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> se conviertan en células citotóxicas activadas por citoquinas, como resultado de la producción de otras citoquinas en el cultivo. Sin embargo, la adición al cultivo de células efectoras del anticuerpo monoclonal anti-IL-2 24 horas antes del ensayo no previene la citotoxicidad.

Somos conscientes de que las células P815 usadas en nuestros ensayos como células diana son muy diferentes a los queratinocitos, pero la importancia funcional de estos experimentos debe ser considerada, al igual que el que estas células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> también expresan CD161, el homólogo humano en ratones de NK1.1 [29], expresado en la mayoría las células NK, un marcador relevante de las células humanas que producen IL-17A [9].

Como hemos reiterado a lo largo de esta tesis, numerosas evidencias sugieren la participación de células Th17 en la patogénesis de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, ni la presencia, ni el papel de estas células en la enfermedad celíaca han sido estudiados en profundidad. Por ello hemos llevado a cabo la caracterización de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> del duodeno de pacientes celíacos, un órgano donde ambas células, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17A se han encontrado recientemente [33].

Nuestros resultados indican que la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca activa contiene una población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IL-17A mayor que la encontrada en la mucosa de individuos control no celíacos. Al igual que las células productoras de IL-17A encontradas en la placa psoriásica en nuestros experimentos, las células T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> derivadas de duodeno celíaco comparten con la clásica población Th17 características fenotípicas, como la expresión de CCR6, CD161 e IL23R, si bien la sobreexpresión de este último receptor en células de la mucosa intestinal no es aceptada unánimemente [149]. Sin embargo se han descrito hasta 24 splicings de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-23 en leucocitos activados [179].

Por otra parte, CD161, como se indicó anteriormente, ha sido propuesto como marcador universal de células productoras de IL-17A [9]. Sin embargo hemos observado en nuestros experimentos que la población CD161<sup>+</sup> no incluye a todas las células productoras de IL-17A<sup>+</sup> de pacientes celíacos, lo que podría implicar que no todas las células IL-17A<sup>+</sup> derivan o proceden del mismo precursor celular.

Nosotros hemos observado que las células productoras de IL-17A de la mucosa celíaca son gliadina-específicas. Esta observación sin embargo, contradice un estudio reciente que indica que las células T reactivas al gluten derivadas de pacientes celíacos tratados producen IL-21, pero no IL-17A o IL-22 [180]. Sin embargo existen diferencias importantes en el abordaje experimental entre los dos estudios.

En primer lugar, ninguno de los pacientes que participan en nuestro estudio ha recibido tratamiento, y los estudios se han realizado con poblaciones cultivadas durante el menor tiempo posible, mientras que Bodd et. al. utilizan en su estudio líneas celulares derivadas de pacientes celíacos que han recibido tratamiento y han sido mantenidas en cultivo por un periodo muy prolongado de tiempo. En segundo lugar, las células que se han utilizado en nuestro estudio se han seleccionado en base a su expresión de CCR6 y posteriormente expandidas en cultivos en presencia de gliadina, mientras que Bodd et. al. no realizaron selección alguna. Y en tercer lugar, nuestras células fueron cultivadas en presencia de IL-23 exógena, una citoquina que es necesaria para mantener el fenotipo IL-17A, mientras que Bodd et. al. cultivaron las células en presencia de IL-2. Al parecer, la combinación de estos tres factores resulta en la expansión de poblaciones que tienen características diferentes. De hecho, en las células obtenidas y estudiadas por dichos autores, solo un pequeño porcentaje de células son reactivas a gliadina de manera restringida por HLA-DQ2. Sin embargo, estos autores detectan la presencia de células T CD4<sup>+</sup>/IL17A<sup>+</sup> en sangre periférica fresca de pacientes celíacos tras una provocación con gluten.

La reactividad de nuestras células está restringida a la gliadina, no observándose proliferación en respuesta a transglutaminasa. Este hallazgo es compatible con datos previos que demuestran que no existe reactividad a transglutaminasa en células de la mucosa intestinal de enfermos celíacos [181], aunque un reciente estudio ha encontrado que células Th1 específicas para transglutaminasa derivadas de sangre periférica de algunos pacientes con enfermedad celíaca activa son capaces de inducir, ex vivo, lesiones típicas en la mucosa intestinal de enfermos celíacos.

El descubrimiento de estas células reactivas está posiblemente influenciado por la situación clínica de los pacientes y por la necesidad de 8-10 semanas de estimulación continuada, lo que indica que aunque un porcentaje pequeño de células reactivas a transglutaminasa se detectaran en nuestros cultivos celulares de corto tiempo, no serían suficientes para contribuir al daño intestinal [182] ni a los resultados obtenidos.

La presencia de células IL-17A<sup>+</sup> específicas para gliadina en la mucosa intestinal de enfermos celíacos constituye una evidencia importante sobre la participación activa de las células Th17 en la patogénesis de la enfermedad celíaca. Hemos encontrado que la activación de las células Th17 de pacientes celíacos está controlada por los mismos factores de transcripción que sus homólogas derivadas de individuos controles no celíacos. No obstante, el patrón de expresión de estos factores de transcripción no es el mismo. Existe una elevada expresión de IRF4 en células T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> derivadas de enfermos celíacos comparada con la expresión que presentan sus homólogas de individuos no celíacos. Este hecho sugiere que un fuerte incremento de los niveles de expresión de IRF4 es necesario para una respuesta Th17 específica frente a péptidos de gliadina. IRF4 facilita la expresión de RORC, un factor de transcripción necesario para la diferenciación de células Th17, tal como fue descrito inicialmente en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) [11]. La detección de la proteína IRF4 en el interior de células IL-17A<sup>+</sup> refuerza la idea de que IRF4 influye en la expresión de RORC en células T IL-17A<sup>+</sup> duodenales específicas para gliadina. Es además destacable que, en el modelo experimental EAE anteriormente mencionado, se consiguió una importante producción de IL-17A en ratones que portaban únicamente una copia del gen IRF4 y que además se rescataba la capacidad de producción de IL-22 [183]. Así pues, es posible que la elevada producción de IL-22 detectada en nuestras células Th17 derivadas de pacientes con celiaquía en comparación con las células productoras de IL-17A de individuos controles estuvieran relacionadas con un aumento de los niveles de expresión de IRF4. Por otro lado, y como era de esperar, niveles de expresión igualmente altos del factor de transcripción RORC se encontraron en células Th17 derivadas de pacientes celíacos y no celíacos.

T-bet, el principal regulador de la diferenciación de células Th1 se expresaba también en células Th17, aunque en niveles inferiores de los de RORC e IRF4. Este hallazgo deja abierta la posibilidad de que células T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> de la mucosa de enfermos celíacos no sean en sentido estricto células Th17 clásicas, o bien que las subpoblaciones Th1 y Th17 clásicas no sean compartimentos cerrados tal y como se ha demostrado por diferentes grupos que ocurre con las células Th17 y las células T

reguladoras [184, 185].

En este aspecto, es de resaltar la producción simultánea de  $\text{IFN}\gamma$ , una citoquina Th1. La producción de  $\text{IFN}\gamma$  por células comprometidas con la producción de IL-17A sustenta claramente un papel importante para ambas,  $\text{IFN}\gamma$  y células Th17 en la patogénesis de la enfermedad celíaca. Sin embargo, si ambas citoquinas se influyen entre sí tanto en su función y/o producción requieren más investigaciones.

Nuestros datos demuestran que mientras las células IL-17A<sup>-</sup> producen IL-21, la cantidad de esta citoquina producida por células Th17 aisladas de pacientes con celiaquía es significativamente mayor. El papel preciso que desempeña la IL-21 en la patogénesis de la enfermedad celíaca aún no está claro. Se han realizado ensayos donde se bloquea la actividad de IL-21 con anti-IL-21 en células T de mucosa intestinal de pacientes celíacos, estas reducen significativamente la producción de IL-17A, resultado que indica la posibilidad de una actividad reguladora de la IL-21 en el control de células T productoras de IL-17A [33]. Por otro lado, se ha sugerido el aumento de expresión de IL-21 en la mucosa de pacientes celíacos no tratados relacionada con exposición al gluten [186]. Estos datos, junto con el nuestro sugieren que la IL-21 tiene un papel en el mantenimiento de la expresión del factor de transcripción T-bet y la producción de  $\text{IFN}\gamma$ , contribuyendo así a la respuesta dominante Th1 observada en la mucosa de pacientes celíacos.

También encontramos que células Th17 derivadas de mucosa celíaca expresan dos citoquinas que poseen actividades duales con efectos opuestos, IL-22 y  $\text{TGF}\beta$ . Ambas citoquinas desempeñan papeles anti y pro-inflamatorios [187], dependiendo de las células diana [188, 189] y del órgano inflamado [190-193]. El hecho de que el receptor de IL-22 se exprese en células epiteliales del intestino [194] y el aumento en la producción de IL-22 por células IL-17A<sup>+</sup> de pacientes celíacos, las cuales producen también  $\text{TGF}\beta$ , permite pensar que las células Th17 podrían tener un papel dual en la enfermedad celíaca: un papel proinflamatorio que podría estar en relación con la vía de citoquinas Th1 que contribuyen a la inflamación de la mucosa y la progresión de la

enfermedad, y otro papel, anti-inflamatorio y protector, ejercido vía TGF $\beta$  e IL-22, que obstaculizaría la respuesta Th1, como ocurre en el caso recientemente observado en un modelo murino de enfermedad inflamatoria intestinal [83]. Por ello es importante dilucidar más precisamente el papel de IL-22 en la patogénesis de la enfermedad celíaca, especialmente porque la IL-22 está siendo objeto de consideración para futuras terapias biológicas en distintas enfermedades debido a su capacidad selectiva de modular la respuesta de los tejidos al tiempo que no ejerce efectos directos sobre la respuesta inmune.

Uno de los descubrimientos más sorprendentes de nuestro estudio es que las células productoras de IL-17A derivadas de pacientes con enfermedad celíaca activa producen TGF $\beta$ . Este resultado añade una nueva característica al papel homeostático del TGF $\beta$  en el intestino, como es la modulación mediante su actividad autocrina o paracrina de la participación de células Th17 en una respuesta específica a gliadina. Tal efecto paradójico se puede relacionar con el hecho de que tumores que secretan elevadas cantidades de TGF $\beta$  inducen el desarrollo de células productoras de IL-17A, que a su vez promueven la supervivencia del tumor de manera IL-17A-dependiente [195]. Se ha descrito un modelo donde la actividad TGF $\beta$  es deficiente en la mucosa de pacientes celíacos debido a la acción de la IL-15, la cual activa señales Jun N-terminal kinasa (JNK) que llevan a la inhibición de TGF $\beta$  [196].

Sin embargo, el efecto dual del TGF $\beta$  en la producción de IL-17A observado en nuestro estudio indica que es activo en el contexto de la mucosa celíaca y refuerza la importancia del papel biológicamente activo del TGF $\beta$  producido por las células IL-17A<sup>+</sup> derivadas de enfermos celíacos, como es el caso de linfocitos intraepiteliales CD8<sup>+</sup>/TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>/NKG2A<sup>+</sup> derivados de pacientes celíacos con actividad reguladora mediada por su secreción de TGF $\beta$  [143]. En este sentido, nuestros resultados indican que las células Th17 que producen TGF $\beta$  no tienen capacidad reguladora sobre células T efectoras estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 (Ortega et. al. manuscrito en preparación). Nosotros no hemos encontrado células CD4<sup>+</sup> derivadas de pacientes celíacos exclusivamente comprometidas con la producción de IL-17A, ya que la

mayor parte de las células T T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> producen IFN $\gamma$  y TGF $\beta$ . Esta es una diferencia significativa con las células Th17 convencionales, las cuales no producen ni IFN $\gamma$  ni TGF $\beta$  y representa otra aportación original de nuestro estudio. Este hecho parece contrastar con los resultados publicados en un estudio previo que demuestra la existencia de células T reguladoras específicas para gliadina (presumiblemente son IL-17A<sup>-</sup>) en la mucosa celiaca [197]. Estos autores demuestran de manera elegante la actividad biológica del TGF $\beta$  desde que su neutralización “in vitro” (usando un anticuerpo monoclonal anti-TGF $\beta$ ) rescató la producción de IFN $\gamma$  por parte de células T en respuesta a gliadina cuando se cocultivaron en presencia de células Tregs, apoyando a las células T reguladoras gliadina-específicas como la fuente principal de TGF $\beta$  en aquel modelo experimental. El modelo de Gianfrani et. al., no obstante, difiere del nuestro en dos aspectos importantes. El primero, que las células Tregs fueron obtenidas de cultivos con elevada presencia de IL-10 exógena, una citoquina no empleada en nuestros experimentos y que nuestras células productoras de IL-17A tampoco producen, y segundo, las células estudiadas por estos autores (células T reguladoras) se obtuvieron en cultivos de larga duración y su capacidad para producir TGF $\beta$  o IL-17A no se estudió específicamente. Nosotros no podemos excluir, no obstante, la posibilidad de que células T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> de mucosa de pacientes celíacos no tratados y células CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>-</sup> de individuos no celíacos pudieran adquirir la habilidad de secretar TGF $\beta$  si los cultivos se extendieran en el tiempo y/o en presencia de otras citoquinas potencialmente presentes en los lugares de inflamación del intestino delgado.

De nuevo, tomadas en conjunto, estas diferencias plantean cuestiones interesantes, como se ha descrito a propósito del modelo psoriásico, como la de dónde se generan o polarizan las células productoras de IL-17A presentes en la mucosa del intestino celiaco. En referencia a este punto, nosotros hemos demostrado previamente que la producción de IL-17A por células de placas psoriásicas puede ser modulada in vitro en condiciones de polarización diferentes [62]. Actualmente se acepta la posibilidad de que células Th17 podrían originarse a partir de células T reguladoras a través de un mecanismo de conversión [198]. Nuestras observaciones de que las

células Th17 producen TGF $\beta$  podrían interpretarse a favor de un origen común de células Th17 y Tregs. Nosotros hemos encontrado, no obstante, que las células Th17 de pacientes celíacos no expresan Foxp3 ni IL-10, observaciones que no contradicen este origen común pero si están en desacuerdo con la posibilidad de que estén en un estado de transición entre células T reguladoras y Th17, ya que nuestras células no poseen ninguna de las características que definen a las células Tregs, a excepción de su capacidad de producción de TGF $\beta$  [198, 199]. Nuestros datos, no obstante, no excluyen de manera formal esta posibilidad, que necesita ser estudiada más profundamente en la enfermedad celíaca. De hecho aumentan las evidencias que apoyan la diversidad y dualidad funcional de las células Th17 [49]. Así por ejemplo, Cosmi et. al. [200] han demostrado recientemente la existencia de células Th17 capaces de producir IL-4 bajo condiciones de polarización apropiadas, añadiendo así nuevos datos que apoyan la plasticidad de las células Th17.

En conclusión, nuestros datos demuestran la presencia de células productoras de IL-17A específicas para el gluten en el duodeno de pacientes afectados de celiaquía, las cuales poseen la habilidad de secretar algunas citoquinas con conocidos efectos duales en procesos inflamatorios. Estos descubrimientos apoyan con fuerza la participación de las células Th17 en la patogénesis de la enfermedad celíaca, y sugieren que las células productoras de IL-17A podrían no estar relacionadas unívocamente con la producción de daño tisular durante respuestas autoinmunes. Así pues, es relevante desde un punto de vista clínico y terapéutico, entender la actividad que desempeñan las células Th17 en la patogenia de la enfermedad celíaca, conocimiento que puede abrir nuevos caminos al tratamiento biológico de la enfermedad.

Entre las implicaciones de los datos descritos previamente está la idea de que las células desarrolladas por vías Th17 o Treg pueden ser anti- o proinflamatorias o pueden resultar neutrales ante la inflamación dependiendo de los estímulos que se encuentren en el medio. Esta posibilidad se ve reforzada por observaciones recientes: Células T Foxp3+ROR $\gamma$ t+ retienen la capacidad de suprimir diabetes autoinmune a pesar de mantener la expresión de ROR $\gamma$ T y la habilidad de producir IL-17A tras su

estimulación [201].

Estos datos y los aportados aquí por nosotros apoyan una nueva perspectiva sobre las células T: Su plasticidad como la norma más que como la excepción. La idea de que las células T mantienen a lo largo de su vida una capacidad diferenciadora dinámica en contraposición al paradigma dogmático de “estado final e irreversible de diferenciación”. Esta nueva forma de entender la funcionalidad de las células T cobra sentido especialmente, en términos de explicar el mantenimiento de la habilidad del huésped para responder a la gran variedad de cambios microbiológicos, en contextos ambientales variables, que le acontecerán después de la involución tímica, provisto que su repertorio TCR sea competente [202, 203].

No puede excluirse la posibilidad de que cada célula T que produce una única combinación de moléculas efectoras sea una subpoblación distinta de células T o por el contrario pertenezcan a un único linaje celular. No obstante, parece probable que la plasticidad de las respuestas de las células T explique las múltiples combinaciones de citoquinas observadas en la inmunidad adaptativa. Parece prudente, particularmente en este caso, prestar atención al filósofo W. de Ockham “La pluralidad no debe ser postulada sin la necesidad”. Una respuesta sencilla es que las células Th17 podrían participar en los programas pro y antiinflamatorios según sea necesario. La plasticidad de esta subpoblación se impone. Por supuesto, la parsimonia no es un principio irrefutable de la lógica, y a lo largo de la historia las hipótesis más simples no siempre han explicado los fenómenos biológicos. Es posible que las células T tengan una especial predisposición a programas particulares de desarrollo, quizás conferida epigenéticamente, en la que cada subpoblación principal contenga un número de variantes posibles capaces de conferir funciones efectoras diferentes, tales como capacidad proliferativa, susceptibilidad a muerte celular inducida por activación, etc. Así, la dilucidación y comprensión de la naturaleza y funciones pleiotrópicas de citoquinas como IL-17A, IL-21, IL-22, TGF $\beta$  y otras Th17 relacionadas representa un reto para la obtención de beneficios clínicos en el futuro inmediato.

# **Conclusiones**



- 1.- La placa psoriásica contiene un aumento significativo de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> (Tc17) en comparación con la piel de individuos sanos.
- 2.- Las células Tc17 derivadas de piel psoriásica producen simultáneamente IL-17A, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-21, IL-22 y TGF $\beta$ .
- 3.- La activación de células Tc17 de piel psoriásica es dependiente de la presencia de TNF $\alpha$ .
- 4.- Las células T reguladoras no inhiben la proliferación de células Tc17.
- 5.- Existe un incremento células Th17 específicas para gliadina en la mucosa intestinal de enfermos celíacos.
- 6.- Las células Th17 derivadas del intestino de pacientes con enfermedad celíaca producen simultáneamente IL-17A, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-21, IL-22 y TGF $\beta$  en respuesta al gluten.
- 7.- Las células Th17 derivadas de la mucosa intestinal de pacientes celíacos requieren de la expresión de los factores de transcripción RORC e IRF4.
- 8.- En pacientes con enfermedad celíaca, la producción de IL-17A por células Th17 específicas para gliadina está regulada de manera autocrina por TGF $\beta$ .



# **Bibliografía**



1. Mosmann, T.R., et al., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol*, 2005. 175(1): p. 5-14.
2. Coffman, R.L., Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol*, 2006. 7(6): p. 539-41.
3. Rengarajan, J., S.J. Szabo, and L.H. Glimcher, Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today*, 2000. 21(10): p. 479-83.
4. Zheng, W. and R.A. Flavell, The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 1997. 89(4): p. 587-96.
5. Aggarwal, S., et al., Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 2003. 278(3): p. 1910-4.
6. Infante-Duarte, C., et al., Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*, 2000. 165(11): p. 6107-15.
7. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*, 2007. 8(9): p. 942-9.
8. Annunziato, F., et al., Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*, 2007. 204(8): p. 1849-61.
9. Cosmi, L., et al., Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med*, 2008. 205(8): p. 1903-16.

10. Wilson, N.J., et al., Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*, 2007. 8(9): p. 950-7.
11. Brustle, A., et al., The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol*, 2007. 8(9): p. 958-66.
12. Harrington, L.E., et al., Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 2005. 6(11): p. 1123-32.
13. Park, H., et al., A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 2005. 6(11): p. 1133-41.
14. Abbas, A.K., *Celular and Molecular Immunology*. 5<sup>a</sup> edición ed, ed. E. Science. 2004, Boston, Massachusetts.
15. Zlotnik, A. and O. Yoshie, Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000. 12(2): p. 121-7.
16. Kohler, R.E., et al., A role for macrophage inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand 20 in immune priming during T cell-mediated inflammation of the central nervous system. *J Immunol*, 2003. 170(12): p. 6298-306.
17. Campbell, J.J., et al., Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*, 1998. 279(5349): p. 381-4.
18. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*, 2007. 8(6): p. 639-46.

19. Annunziato, F., et al., Human Th17 cells: are they different from murine Th17 cells? *Eur J Immunol*, 2009. 39(3): p. 637-40.
20. Eriksson, U., et al., Activation of dendritic cells through the interleukin 1 receptor 1 is critical for the induction of autoimmune myocarditis. *J Exp Med*, 2003. 197(3): p. 323-31.
21. Rangachari, M., et al., T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med*, 2006. 203(8): p. 2009-19.
22. Hirota, K., et al., Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*, 2007. 204(12): p. 2803-12.
23. Chung, Y., et al., Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, 2009. 30(4): p. 576-87.
24. McGeachy, M.J., et al., TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*, 2007. 8(12): p. 1390-7.
25. McGeachy, M.J., et al., The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*, 2009. 10(3): p. 314-24.
26. Oppmann, B., et al., Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 2000. 13(5): p. 715-25.

27. Kastelein, R.A., C.A. Hunter, and D.J. Cua, Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2007. 25: p. 221-42.
28. Cua, D.J., et al., Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 2003. 421(6924): p. 744-8.
29. Lanier, L.L., C. Chang, and J.H. Phillips, Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol*, 1994. 153(6): p. 2417-28.
30. Takahashi, T., S. Dejbakhsh-Jones, and S. Strober, Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities. *J Immunol*, 2006. 176(1): p. 211-6.
31. Maggi, L., et al., CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur J Immunol*.
32. Annunziato, F. and S. Romagnani, Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(6): p. 257.
33. Monteleone, I., et al., Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa. *J Immunol*. 184(4): p. 2211-8.
34. Chen, Z., A. Laurence, and J.J. O'Shea, Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol*, 2007. 19(6): p. 400-8.
35. Evans, H.G., et al., Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(43): p. 17034-9.

36. Liu, H. and C. Rohowsky-Kochan, Regulation of IL-17 in human CCR6+ effector memory T cells. *J Immunol*, 2008. 180(12): p. 7948-57.
37. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol*, 2008. 9(6): p. 641-9.
38. Volpe, E., et al., A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*, 2008. 9(6): p. 650-7.
39. Yang, L., et al., IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*, 2008. 454(7202): p. 350-2.
40. Santarlasci, V., et al., TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol*, 2009. 39(1): p. 207-15.
41. Fontenot, J.D., et al., Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 2005. 22(3): p. 329-41.
42. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(14): p. 5126-31.
43. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003. 299(5609): p. 1057-61.
44. Yang, X.O., et al., T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*, 2008. 28(1): p. 29-39.

45. Zhou, L., et al., TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature*, 2008. 453(7192): p. 236-40.
46. Chaudhry, A., et al., CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*, 2009. 326(5955): p. 986-91.
47. Koch, M.A., et al., The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*, 2009. 10(6): p. 595-602.
48. Zheng, Y., et al., Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature*, 2009. 458(7236): p. 351-6.
49. O'Connor, W., Jr., L.A. Zenewicz, and R.A. Flavell, The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function. *Nat Immunol*. 11(6): p. 471-6.
50. Bettelli, E., et al., Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006. 441(7090): p. 235-8.
51. Fantini, M.C., et al., IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between Treg and Th17 cells. *Eur J Immunol*, 2007. 37(11): p. 3155-63.
52. Hill, J.A., et al., Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4+CD44hi Cells. *Immunity*, 2008. 29(5): p. 758-70.
53. Ivanov, II, et al., The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 2006. 126(6): p. 1121-33.

54. Beriou, G., et al., IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood*, 2009. 113(18): p. 4240-9.
55. Chen, Z., et al., Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum*, 2007. 56(9): p. 2936-46.
56. van Beelen, A.J., et al., Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2007. 7(5): p. 374-81.
57. Annunziato, F., et al., The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol*, 2008. 20(11): p. 1361-8.
58. Burrell, B.E., et al., CD8+ Th17 mediate costimulation blockade-resistant allograft rejection in T-bet-deficient mice. *J Immunol*, 2008. 181(6): p. 3906-14.
59. Huber, M., et al., A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol*, 2009. 39(7): p. 1716-25.
60. Intlekofer, A.M., et al., Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science*, 2008. 321(5887): p. 408-11.
61. Kondo, T., et al., Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol*, 2009. 182(4): p. 1794-8.
62. Ortega, C., et al., IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J Leukoc Biol*, 2009. 86(2): p. 435-43.
63. Kuang, D.M., et al., Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8+ T cells in hepatocellular carcinoma patients. *J Immunol*. 185(3): p. 1544-9.

64. Henriques, A., et al., Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Immunol.* 264(1): p. 97-103.
65. Yen, H.R., et al., Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J Immunol*, 2009. 183(11): p. 7161-8.
66. Zhou, L., et al., IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*, 2007. 8(9): p. 967-74.
67. Laurence, A., et al., Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 2007. 26(3): p. 371-81.
68. Yang, X.O., et al., STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem*, 2007. 282(13): p. 9358-63.
69. Mangan, P.R., et al., Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 2006. 441(7090): p. 231-4.
70. Nurieva, R., et al., Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, 2007. 448(7152): p. 480-3.
71. Veldhoen, M., et al., TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 2006. 24(2): p. 179-89.
72. Ciric, B., et al., IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells. *J Immunol*, 2009. 182(9): p. 5296-305.
73. Weaver, C.T., et al., IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 2007. 25: p. 821-52.

74. Zelante, T., et al., IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol*, 2007. 37(10): p. 2695-706.
75. Happel, K.I., et al., Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med*, 2005. 202(6): p. 761-9.
76. Ye, P., et al., Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*, 2001. 194(4): p. 519-27.
77. Happel, K.I., et al., Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol*, 2003. 170(9): p. 4432-6.
78. Romani, L. and P. Puccetti, Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol*, 2006. 14(4): p. 183-9.
79. Hohl, T.M., A. Rivera, and E.G. Pamer, Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol*, 2006. 18(4): p. 465-72.
80. Ye, P., et al., Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. 25(3): p. 335-40.
81. Chung, D.R., et al., CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol*, 2003. 170(4): p. 1958-63.
82. Langrish, C.L., et al., IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 2005. 201(2): p. 233-40.
83. O'Connor, W., Jr., et al., A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol*, 2009. 10(6): p. 603-9.

84. Lundy, S.K., et al., Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther*, 2007. 9(1): p. 202.
85. Lubberts, E., et al., IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol*, 2001. 167(2): p. 1004-13.
86. Shahrara, S., et al., IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 2009. 182(6): p. 3884-91.
87. Hymowitz, S.G., et al., IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J*, 2001. 20(19): p. 5332-41.
88. Iwakura, Y. and H. Ishigame, The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest*, 2006. 116(5): p. 1218-22.
89. Komiyama, Y., et al., IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2006. 177(1): p. 566-73.
90. Krueger, J.G., The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol*, 2002. 46(1): p. 1-23; quiz 23-6.
91. Schon, M.P. and W.H. Boehncke, Psoriasis. *N Engl J Med*, 2005. 352(18): p. 1899-912.
92. Carmeliet, P., Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 653-60.
93. Heidenreich, R., M. Rocken, and K. Ghoreschi, Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *Int J Exp Pathol*, 2009. 90(3): p. 232-48.

94. Wieder, T., et al., T cell-mediated help against tumors. *Cell Cycle*, 2008. 7(19): p. 2974-7.
95. Leung, D.Y., et al., Evidence for a streptococcal superantigen-driven process in acute guttate psoriasis. *J Clin Invest*, 1995. 96(5): p. 2106-12.
96. Lewis, H.M., et al., Restricted T-cell receptor V beta gene usage in the skin of patients with guttate and chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol*, 1993. 129(5): p. 514-20.
97. Henderson, C.A. and A.S. Highet, Acute psoriasis associated with Lancefield Group C and Group G cutaneous streptococcal infections. *Br J Dermatol*, 1988. 118(4): p. 559-61.
98. Rosenberg, E.W. and P.W. Noah, The Koebner phenomenon and the microbial basis of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 1988. 18(1 Pt 1): p. 151-8.
99. Nickoloff, B.J., The cytokine network in psoriasis. *Arch Dermatol*, 1991. 127(6): p. 871-84.
100. Nickoloff, B.J., et al., Accessory cell function of keratinocytes for superantigens. Dependence on lymphocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. *J Immunol*, 1993. 150(6): p. 2148-59.
101. Valdimarsson, H., et al., Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today*, 1995. 16(3): p. 145-9.
102. Prinz, J.C., Psoriasis vulgaris--a sterile antibacterial skin reaction mediated by cross-reactive T cells? An immunological view of the pathophysiology of psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, 2001. 26(4): p. 326-32.

103. Nestle, F.O., D.H. Kaplan, and J. Barker, Psoriasis. *N Engl J Med*, 2009. 361(5): p. 496-509.
104. Bos, J.D., et al., Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res*, 1983. 275(3): p. 181-9.
105. Braun-Falco, O. and G. Burg, [Inflammatory infiltrate in psoriasis vulgaris. A cytochemical study]. *Arch Klin Exp Dermatol*, 1970. 236(3): p. 297-314.
106. Nickoloff, B.J., Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe? *J Clin Invest*, 1999. 104(9): p. 1161-4.
107. Lowes, M.A., A.M. Bowcock, and J.G. Krueger, Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 2007. 445(7130): p. 866-73.
108. Farber, E.M. and M.L. Nall, The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica*, 1974. 148(1): p. 1-18.
109. Capon, F., et al., Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene. *J Invest Dermatol*, 2002. 118(5): p. 745-51.
110. Allen, M.H., et al., The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2005. 124(1): p. 103-6.
111. Gudjonsson, J.E., et al., Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol*, 2004. 135(1): p. 1-8.
112. Nestle, F.O., L.A. Turka, and B.J. Nickoloff, Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest*, 1994. 94(1): p. 202-9.

113. Nestle, F.O., et al., Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med*, 2005. 202(1): p. 135-43.
114. McKenzie, B.S., R.A. Kastelein, and D.J. Cua, Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*, 2006. 27(1): p. 17-23.
115. Sugiyama, H., et al., Dysfunctional blood and target tissue CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*, 2005. 174(1): p. 164-73.
116. Kryczek, I., et al., Induction of IL-17<sup>+</sup> T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J Immunol*, 2008. 181(7): p. 4733-41.
117. Lowes, M.A., et al., Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol*, 2008. 128(5): p. 1207-11.
118. Homey, B., et al., Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol*, 2000. 164(12): p. 6621-32.
119. Chan, J.R., et al., IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med*, 2006. 203(12): p. 2577-87.
120. Zaba, L.C., et al., Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol*, 2009. 129(1): p. 79-88.
121. Kagami, S., et al., Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 130(5): p. 1373-83.

122. Di Cesare, A., P. Di Meglio, and F.O. Nestle, The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2009. 129(6): p. 1339-50.
123. Zheng, Y., et al., Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, 2007. 445(7128): p. 648-51.
124. Piskin, G., et al., In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J Immunol*, 2006. 176(3): p. 1908-15.
125. Buchau, A.S. and R.L. Gallo, Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clin Dermatol*, 2007. 25(6): p. 616-24.
126. Wolk, K., et al., The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol*, 2009. 39(12): p. 3570-81.
127. Shan, L., et al., Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 2002. 297(5590): p. 2275-9.
128. Kagnoff, M.F., Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest*, 2007. 117(1): p. 41-9.
129. Sollid, L.M., Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(9): p. 647-55.
130. Green, P.H. and B. Jabri, Coeliac disease. *Lancet*, 2003. 362(9381): p. 383-91.
131. van de Wal, Y., et al., Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *Eur J Immunol*, 1999. 29(10): p. 3133-9.

132. Molberg, O., et al., Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology*, 2003. 125(2): p. 337-44.
133. Dewar, D.H., et al., The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2006. 18(5): p. 483-91.
134. Louka, A.S. and L.M. Sollid, HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens*, 2003. 61(2): p. 105-17.
135. Mazzarella, G., et al., An immunodominant DQ8 restricted gliadin peptide activates small intestinal immune response in in vitro cultured mucosa from HLA-DQ8 positive but not HLA-DQ8 negative coeliac patients. *Gut*, 2003. 52(1): p. 57-62.
136. Lundin, K.E., et al., T lymphocyte recognition of a celiac disease-associated cis- or trans-encoded HLA-DQ alpha/beta-heterodimer. *J Immunol*, 1990. 145(1): p. 136-9.
137. Lundin, K.E., et al., T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8. *Hum Immunol*, 1994. 41(4): p. 285-91.
138. Dieterich, W., et al., Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*, 1997. 3(7): p. 797-801.
139. Molberg, O., et al., Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med*, 1998. 4(6): p. 713-7.

140. Hayday, A., et al., Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol*, 2001. 2(11): p. 997-1003.
141. Ensari, A., Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease): controversies in diagnosis and classification. *Arch Pathol Lab Med*. 134(6): p. 826-36.
142. Fujihashi, K., et al., Immunoregulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes: gamma/delta T cell receptor-positive (TCR+) T cells abrogate oral tolerance, while alpha/beta TCR+ T cells provide B cell help. *J Exp Med*, 1992. 175(3): p. 695-707.
143. Bhagat, G., et al., Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest*, 2008. 118(1): p. 281-93.
144. Koning, F., The molecular basis of celiac disease. *J Mol Recognit*, 2003. 16(5): p. 333-6.
145. Sollid, L.M., Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol*, 2000. 18: p. 53-81.
146. Green, P.H. and B. Jabri, Celiac disease and other precursors to small-bowel malignancy. *Gastroenterol Clin North Am*, 2002. 31(2): p. 625-39.
147. Qiao, S.W., et al., Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol*, 2004. 173(3): p. 1757-62.
148. Nilsen, E.M., et al., Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut*, 1995. 37(6): p. 766-76.

149. Nilsen, E.M., et al., Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology*, 1998. 115(3): p. 551-63.
150. Troncone, R., et al., Majority of gliadin-specific T-cell clones from celiac small intestinal mucosa produce interferon-gamma and interleukin-4. *Dig Dis Sci*, 1998. 43(1): p. 156-61.
151. Bethune, M.T. and C. Khosla, Parallels between pathogens and gluten peptides in celiac sprue. *PLoS Pathog*, 2008. 4(2): p. e34.
152. Jabri, B., et al., Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology*, 2000. 118(5): p. 867-79.
153. Meresse, B., et al., Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*, 2004. 21(3): p. 357-66.
154. Meresse, B., et al., Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med*, 2006. 203(5): p. 1343-55.
155. Di Sabatino, A., et al., Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut*, 2006. 55(4): p. 469-77.
156. Maiuri, L., et al., Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*, 2000. 119(4): p. 996-1006.

157. Mention, J.J., et al., Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*, 2003. 125(3): p. 730-45.
158. Hue, S., et al., A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*, 2004. 21(3): p. 367-77.
159. Markiewicz, M.A., et al., Costimulation through NKG2D enhances murine CD8+ CTL function: similarities and differences between NKG2D and CD28 costimulation. *J Immunol*, 2005. 175(5): p. 2825-33.
160. Roberts, A.I., et al., NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol*, 2001. 167(10): p. 5527-30.
161. Puig, L., et al., [Consensus document on the evaluation and treatment of moderate-to-severe psoriasis. Spanish psoriasis group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology]. *Actas Dermosifiliogr*, 2009. 100(4): p. 277-86.
162. Callen, J.P., et al., AAD consensus statement on psoriasis therapies. *J Am Acad Dermatol*, 2003. 49(5): p. 897-9.
163. Basso, A.S., H. Cheroutre, and D. Mucida, More stories on Th17 cells. *Cell Res*, 2009. 19(4): p. 399-411.
164. Jabri, B. and L.M. Sollid, Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(12): p. 858-70.
165. Chen, Z., et al., FOXP3 and ROR $\gamma$ mat: Transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol*.

166. Jenkinson, S.E., et al., The alphaE(CD103)beta7 integrin interacts with oral and skin keratinocytes in an E-cadherin-independent manner\*. *Immunology*.
167. Simonitsch, I., et al., Expression of monoclonal antibody HML-1-defined alpha E beta 7 integrin in cutaneous T cell lymphoma. *Am J Pathol*, 1994. 145(5): p. 1148-58.
168. Conrad, C., et al., Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nat Med*, 2007. 13(7): p. 836-42.
169. Michel, M.L., et al., Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med*, 2007. 204(5): p. 995-1001.
170. Shibata, K., et al., Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production. *J Immunol*, 2007. 178(7): p. 4466-72.
171. Haider, A.S., et al., Identification of cellular pathways of "type 1," Th17 T cells, and TNF- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of cyclosporine A in psoriasis. *J Immunol*, 2008. 180(3): p. 1913-20.
172. Haider, A.S., et al., Insights into gene modulation by therapeutic TNF and IFNgamma antibodies: TNF regulates IFNgamma production by T cells and TNF-regulated genes linked to psoriasis transcriptome. *J Invest Dermatol*, 2008. 128(3): p. 655-66.
173. Cho, M.L., et al., Cyclosporine A inhibits IL-15-induced IL-17 production in CD4+ T cells via down-regulation of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Immunol Lett*, 2007. 108(1): p. 88-96.

174. Chauhan, S.K., et al., Autoimmunity in dry eye is due to resistance of Th17 to Treg suppression. *J Immunol*, 2009. 182(3): p. 1247-52.
175. Romero, P., et al., Expression of CD94 and NKG2 molecules on human CD4(+) T cells in response to CD3-mediated stimulation. *J Leukoc Biol*, 2001. 70(2): p. 219-24.
176. Ortega, C., et al., Role for NKG2-A and NKG2-C surface receptors in chronic CD4+ T-cell responses. *Immunol Cell Biol*, 2004. 82(6): p. 587-95.
177. Ruckert, R., et al., Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis? *J Immunol*, 2000. 165(4): p. 2240-50.
178. Villadsen, L.S., et al., Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J Clin Invest*, 2003. 112(10): p. 1571-80.
179. Kan, S.H., G. Mancini, and G. Gallagher, Identification and characterization of multiple splice forms of the human interleukin-23 receptor alpha chain in mitogen-activated leukocytes. *Genes Immun*, 2008. 9(7): p. 631-9.
180. Bodd, M., et al., HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. *Mucosal Immunol*. 3(6): p. 594-601.
181. Molberg, O., et al., T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *Eur J Immunol*, 2001. 31(5): p. 1317-23.
182. Ciccocioppo, R., et al., Isolation and characterization of circulating tissue transglutaminase-specific T cells in coeliac disease. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 23(1): p. 179-91.

183. Liang, S.C., et al., Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*, 2006. 203(10): p. 2271-9.
184. Afzali, B., et al., Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 159(2): p. 120-30.
185. Weaver, C.T. and R.D. Hatton, Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(12): p. 883-9.
186. Fina, D., et al., Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. *Gut*, 2008. 57(7): p. 887-92.
187. Sanjabi, S., et al., Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol*, 2009. 9(4): p. 447-53.
188. Weiss, B., et al., Cloning of murine IL-22 receptor alpha 2 and comparison with its human counterpart. *Genes Immun*, 2004. 5(5): p. 330-6.
189. Wolk, K., et al., IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*, 2004. 21(2): p. 241-54.
190. Zenewicz, L.A., et al., Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity*, 2007. 27(4): p. 647-59.
191. Sugimoto, K., et al., IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest*, 2008. 118(2): p. 534-44.

192. Zenewicz, L.A., et al., Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity*, 2008. 29(6): p. 947-57.
193. Chang, H., et al., Hydrodynamic-based delivery of an interleukin-22-Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Immunol*, 2006. 177(6): p. 3635-43.
194. Wolk, K., et al., IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol*, 2007. 178(9): p. 5973-81.
195. Nam, J.S., et al., Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Res*, 2008. 68(10): p. 3915-23.
196. Benahmed, M., et al., Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology*, 2007. 132(3): p. 994-1008.
197. Gianfrani, C., et al., Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol*, 2006. 177(6): p. 4178-86.
198. Ayyoub, M., et al., Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(21): p. 8635-40.
199. Leveque, L., et al., Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4+ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells. *J Immunother*, 2009. 32(2): p. 101-8.

200. Cosmi, L., et al., Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol.* 2010. 125(1): p. 222-30 e1-4.
201. Tatar, D.M. et al, Foxp3+ROR $\gamma$ t+ T helper intermediates display suppressive function against autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 2010. 184: p: 3377-85.
- 202.- Bluestone, J.A. et al., The functional plasticity of T cells subsets. *Nat, Rev. Immunol.* 2009. 9. p: 811-16.
203. O'Shea, J.J., et al., Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science.* 2010. 327. p: 1098-1102.



# **Anexos**



## **Anexo I: Índice de Figuras**



	<b>Páginas</b>
<b>Figura 1.- Aislamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.....</b>	<b>73</b>
<b>Figuras 2-5.- Expresión de citoquinas en linfocitos T CD8<sup>+</sup>.....</b>	<b>74</b>
<b>Figuras 6-14.- Fenotipo de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>.....</b>	<b>77</b>
<b>Figuras 15-20.- Regulación transcripcional de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>.....</b>	<b>83</b>
<b>Figuras 21-26.- Estudio funcional de células T CD8<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>.....</b>	<b>86</b>
<b>Figuras 27-38.- Aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.....</b>	<b>95</b>
<b>Figuras 39-40.- Regulación transcripcional de células T CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>.....</b>	<b>104</b>
<b>Figuras 41-43.- Actividad funcional del TGFβ.....</b>	<b>106</b>



## **Anexo II: Índice de Abreviaturas**



- APC.-** Células Presentadoras de Antígeno.
- APC.-** Alofocianina.
- CFSE.-** 5-Carboxifluorescin diacetato succinimidil.
- CTL.-** Linfocitos T citotóxico.
- EAE.-** Encefalitis Alérgica Experimental.
- EAU.-** Uveitis Autoinmune Experimental.
- EC.-** Enfermedad Celíaca.
- EDTA.-** Ácido etilendiamino tetracético.
- FITC.-** Fluoresceína Isotiocianato.
- Foxp3.-** Forkhead box p3.
- G-CSF.-** Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos.
- HCC.-** Carcinoma hepatocelular.
- HEPES.-** Ácido N-2-Hidroxitilpiperacina-N-2-Etanosulfónico.
- HLA.-** Antígeno Leucocitario Humano.
- IBD.-** Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
- IEL.-** Linfocitos Intraepiteliales.
- IL-1.-** Interleuquina 1.
- IL-10.-** Interleuquina 10.
- IL-13.-** Interleuquina 13.
- IL-15.-** Interleuquina 15.
- IL-17A.-** Interleuquina 17A.
- IL-17F.-** Interleuquina 17F.
- IL-2.-** Interleuquina 2.
- IL-21.-** Interleuquina 21.
- IL-22.-** Interleuquina 22.
- IL-23.-** Interleuquina 23.
- IL-23R.-** Receptor de Interleuquina 23.
- IL-4.-** Interleuquina 4.
- IL-5.-** Interleuquina 5.
- IL-6.-** Interleuquina 6.
- INF $\gamma$ -** Interferón gamma.

- IRF4.-** Factor 4 Regulador del Interferón
- MHC.-** Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- MIP-3 $\alpha$ .-** Proteína Inflamatoria de macrófagos 3 $\alpha$ .
- NK.-** Células Natural Killer.
- PBMC.-** Células Mononucleares de Sangre Periférica.
- PBS.-** Solución salina tamponada.
- PCR.-** Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- PE.-** Ficoeritrina.
- PE-Cy7.-** Ficoeritrina-Cy7.
- PHA.-** Fitohemaglutinina.
- PMA.-** Phorbol 12-Myristate 13 Acetate.
- RA.-** Artritis Reumatoide.
- ROR.-** Receptor de Ácido Retinoico.
- TCR.-** Receptor de célula T.
- TG2.-** Transglutaminasa tisular.
- TGF $\beta$ .-** Factor transformante del crecimiento  $\beta$ .
- TNF $\alpha$ .-** Factor de Necrosis Tumoral alfa.
- Treg.-** Células T reguladoras.

## **Anexo III: Publicaciones**



Uncorrected Version. Published on June 1, 2009 as DOI:10.1189/JLB.0109046

JLB

Article

## IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines

Consuelo Ortega,\* Silvia Fernández-A,\* Juan M. Carrillo,<sup>†</sup> Pilar Romero,\* Ignacio J. Molina,<sup>‡</sup> José C. Moreno,<sup>§</sup> and Manuel Santamaría\*<sup>\*,†,1</sup>

\*Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, and Servicio de <sup>†</sup>Inmunología y <sup>§</sup>Dermatología, Hospital Universitario Reina Sofía, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain; and <sup>‡</sup>Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain

RECEIVED JULY 28, 2009; REVISED MARCH 23, 2009; ACCEPTED APRIL 9, 2009. DOI: 10.1189/JLB.0109046

### ABSTRACT

IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (Th17) are currently considered relevant participants in the pathogenesis of psoriasis skin lesions. However, little is known about the potential role of IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells, which are also present at the psoriatic plaque. We have addressed the functional characterization of this CD8<sup>+</sup> subtype of T lymphocytes from psoriasis patients. Our results show that CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> cells from psoriasis-inflamed skin tissue produce TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (Th1-related cytokines) as well as IL-17, IL-21, and IL-22 (Th17-related cytokines) efficiently. A significant up-regulation of the RORC transcription factor is also observed. These cells are refractory to Tregs but show a proliferative response to anti-CD3/CD28 stimulation that is enhanced by IL-12 and IL-15. Blocking of TNF- $\alpha$  activity inhibits TCR-mediated activation and IL-17 production. CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> T cells are cytotoxic cells that display TCR/CD3-mediated cytotoxic abilities to kill target cells. Thus, CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> T cells share some key features with Th17 cells and exhibit remarkable differential abilities attributable to the CD8<sup>+</sup> lineage of T lymphocytes, adding new insights into the functional resources of IL-17-producing cells from human epidermis that could be of potential interest to our understanding of the pathogenesis of psoriasis. *J. Leukoc. Biol.* **86**: 000–000; 2009.

### Introduction

Psoriasis vulgaris is a cutaneous inflammatory disease mediated by activated cellular components of the immune system and their products, such as inflammatory cytokines [1–3]. Of these, IFN- $\gamma$ , produced by Th1 cells, has been considered for many years as the main responsible factor for psoriasis pathogenesis [4]. However, recent advances suggest CD4<sup>+</sup> T lymphocytes

producing IL-17, so-called Th17 cells, as new relevant actors in the pathogenesis of the disease [5, 6]. Th17 cells have been detected recently in the dermis of psoriatic patients [7]. Th17 cells differentiate from naive CD4<sup>+</sup> T cells under the stimulation of IL-1 and IL-6, but their maintenance is dependent on IL-23, a cytokine produced by keratinocytes, Langerhans cells, DC, and macrophages [8]. Human Th17 cells are characterized by the expression of the transcriptional factor ROR $\gamma$ t [9], the IL-23R, and the CCR6 [10]. Th17 cells enter the skin by a chemotactic mechanism triggered after the conspicuously expressed CCR4 and CCR6 receptors bind CCL17 and CCL20 chemokine, respectively [11, 12]. Th17 cells produce IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-21 [13], and also IL-22, which is strongly up-regulated during chronic inflammatory disorders and in the skin, can induce acanthosis and dermal inflammation [14, 15]. In addition, patients treated with the TNF- $\alpha$ -inhibitor *etanercept* showed reduced serum levels of IL-17 and IL-22 at the time of disease clearing [16]. The expression of IL-23 is also highly enhanced in psoriatic skin lesions, supporting that the IL-23/IL-17 cytokine axis is fully operational in the pathogenesis of psoriasis [17].

IL-17 can be produced by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, both present in psoriatic skin. The elucidation of the functional role of Th17 cells has attracted great attention from investigators. Rapidly growing information demonstrates their participation in several immunopathogenic processes, including psoriasis [18, 19]. However, little is known about the role of IL-17-producing CD8<sup>+</sup> lymphocytes in a normal immune response or in certain disease conditions. In the skin, CD8<sup>+</sup> cells are preferentially present in the epidermis [20, 21], and recently, they have been detected in psoriatic lesions augmented significantly with respect to healthy subjects' skin [22], the first report showing this feature on a human autoimmune disease.

We have addressed the characterization of CD8<sup>+</sup> cells producing IL-17 from the affected skin of patients with psoriasis.

Abbreviations: DC=dendritic cell(s), FoxP3=forkhead box P3, HPRT1=hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1, RORC=retinoic acid receptor-related orphan receptor C, Tregs=T regulatory cells

1. Correspondence: Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Reina Sofía, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain. E-mail: msantamaria@uco.es

# JLB

Our results show that CD8<sup>+</sup>-producing IL-17 cells share some, but not all, phenotypical and molecular features with Th17 cells but are functionally different. We present in this study evidence that supports a distinct functional role of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells in the pathogenesis of psoriasis.

## MATERIALS AND METHODS

### Clinical samples

PBMC and skin punch biopsies (6 mm diameter) were obtained from patients with psoriasis ( $n=11$ ). Healthy donors skin samples consist of abdominoplasty surgical waste ( $n=5$ ). Samples were obtained following protocols approved by the Institutional Review Board of Reina Sofia University Hospital (Spain); the Declaration of Helsinki Principles was followed, and patients and healthy control individuals gave written, informed consent. Psoriatic lesion biopsies (two/patient) were collected from patients with moderate to severe psoriasis. Biopsies were taken from the forearm ( $n=7$ ) or abdominal surface ( $n=4$ ). Major inclusion criteria were the following: psoriasis vulgaris involving >10% of body surface area; no systemic treatment for at least 2 weeks or topical treatment for at least 1 week before entering the study; no significant infections or immune suppression; and no other significant medical disease. Nine patients were studied at diagnosis, and two patients entered the study with a previous history of psoriasis treated with topical steroids. Control donors had no personal or familiar history of psoriasis and were free of inflammatory skin disease at the time of biopsy.

### Immune cell isolation

Single-cell suspensions were prepared from PBMC and skin tissue samples. PBMC from freshly drawn blood were purified by gradient centrifugation with Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich Corp., Spain). Skin samples were incubated overnight in 0.5% dispase (Sigma-Aldrich Corp.) and 1 mg/ml collagenase (Roche, Indianapolis, IN, USA) at 4°C, the epidermis separated, and the dermis cultured for 2 days at 37°C in RPMI 1640 (BioWittaker, Lonza, Verviers, Belgium) with 5% pooled human serum, 0.1% gentamicin (Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), and 1% 1 mol/L HEPES buffer (Sigma-Aldrich Corp.). Epidermal single-cell suspensions were obtained by incubation in 0.25% trypsin/EDTA (BioWittaker, Cambrex, Verviers, Belgium) for 15 min at 37°C. Cells were cultured for an additional 24 h to obtain epidermal T cells. After analysis of bulk populations, CCR6<sup>+</sup> cells were sorted on a FACSVantage cell sorter. CD8<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> cell fraction containing >95% of IL-17-producing cells (CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) and the remaining population (CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup>) were expanded further.

CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> cells were obtained from dermal cultures in the presence of CD3/CD28-coated beads for 5 days. The Th17 cell line was established from umbilical cord blood. T cells were stimulated with CD3/CD28-coated beads, and after 3–5 days, proliferating T cells were expanded further under limiting dilution conditions in 96 U-round-well plates in the presence of 5 ng/ml IL-1 $\beta$  and 10 ng/ml IL-6, 5 ng/ml TGF- $\beta$  (all from Sigma-Aldrich Corp.), and anti-IFN- $\gamma$  (10  $\mu$ g/ml) and anti-IL-4 (10  $\mu$ g/ml) neutralizing mAb. Cells were restimulated with CD3/CD28-coated beads every 5 days, and fresh medium, cytokines, and neutralizing antibodies were replenished.

### Flow cytometry

For surface-direct staining, cells were incubated with fluorochrome-conjugated antibodies on ice for 30 min in the dark and washed twice before analysis. FITC, Alexa Fluor 647, PE, allophycocyanin, or PE-Cy7-conjugated anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD25, -CD45RA, -CD45RO, -CD56, -CD69, and -CD103 mAb and isotype-matched control mAb were purchased from BD Biosciences (Spain). Antibodies to TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$ , CD28, CD94, CD314 (NKG2D), and CCR5 (CD195) were from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Anti-FoxP3 mAb was purchased to eBioscience (San Diego,

CA, USA). Antibodies to NKG2C, CCR2, CCR6, and IL-23R were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). For intracellular staining, cells were activated with lymphocyte activation cocktail PMA, 40 ng/ml, and ionomycin, 1  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich Corp.), for 6 h at 37°C prior to staining and were fixed and permeabilized with the cytofix/cytoperm kit with BD Golgi plug (BD Pharmingen), according to the manufacturer's protocol; unactivated control was included in the assays and treated with brefeldin A only. The following anti-human mAb were used: anti-IFN- $\gamma$  and anti-TNF- $\alpha$  (both from BD Biosciences), anti-IL-22 (R&D Systems), and anti-IL-17 and anti-IL-21 (both from eBioscience). Mouse IgG1 and IgG2 (BD Biosciences) were used as isotype controls. A FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, Spain) was used, and flow data analysis was performed using FACSDiva software.

### Cytokine analysis

Secreted IL-17, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  were determined with a human cytokine/chemokine multiplex immunoassay (Linco Research, Inc., St. Charles, MO, USA), IL-21, and IL-22, using ELISA assays (Bender MedSystems, Burlingame, CA, USA), following the manufacturer's instructions. T cells were stimulated with anti-CD3/28 microbeads. After culture for 24 h at 37°C, culture supernatants were collected and stored at -80°C until used.

### Proliferation assays and T cell expansion

For proliferation assays, T cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) were stimulated with Dynabeads CD3/28 T cell expander (DynaL Biotech ASA, Oslo, Norway) for 4 days in the absence or presence of different cytokines: 10 IU/ml IL-2, 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , 20 ng/ml IL-6, and 5 ng/ml TGF- $\beta$  (all from Sigma-Aldrich Corp.); 2.5 ng/ml IL-12 and 7 ng/ml IL-15 (BD Pharmingen); and 20 ng/ml IL-23 (eBioscience). Culture wells were pulsed for the last 16 h with 0.5  $\mu$ Ci/well <sup>3</sup>H-thymidine (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA) and harvested, and <sup>3</sup>H-thymidine uptake was measured by scintillation counting (Betaplate 1205, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). Tregs were isolated from healthy volunteer's peripheral blood using a CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), following the manufacturer's instructions and cocultured with CFSE-labeled (Fluka, Sigma-Aldrich Corp.) T cells at a 1:1 ratio and stimulated with anti-CD3/28-coupled microbeads. After 5 days, proliferation was determined on a FACSCalibur flow cytometer with CellQuest Pro software (BD Biosciences). Treg populations obtained were in all cases CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (>93%). For some experiments, T cells were sorted for CD8<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> expression using a FACSVantage sorter (BD Biosciences) and in vitro-expanded for 7 days in complete medium consisting of RPMI 1640-supplemented 5% pooled human serum and 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich Corp.) and 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (both from Life Technologies, Chagrin Falls, OH, USA) stimulated with anti-CD3/28 microbeads. For TNF- $\alpha$  blockade experiments, T cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were cultured in the presence or absence of doubling amounts (1–8  $\mu$ g/ml) of anti-TNF mAb (BD Biosciences) and stimulated with anti-CD3/CD28 microbeads. After 6 h incubation at 37°C, culture supernatants were harvested, IL-17 content determined, and expression of CD69 analyzed by flow cytometry.

### Effect of polarizing conditions on IL-17 production by psoriatic CD8<sup>+</sup> cells

T cells ( $10^6$ /ml) were stimulated with anti-CD3/CD28, 5 ng/ml IL-1 $\beta$ , and 10 ng/ml IL-6 for 4 days in the presence or absence of anti-IFN- $\gamma$  (10  $\mu$ g/ml) and anti-IL-4 (10  $\mu$ g/ml).

### Cytotoxicity assays

Control and psoriatic CD8<sup>+</sup> T cells, IL-17<sup>+</sup> or IL-17<sup>-</sup>, were tested against the murine P815 mastocytoma cell line at E:T ratios 1:1, 10:1, and 40:1. For redirected lysis (TCR/CD3-dependent), P815 cells were preincubated for 30 min with 5  $\mu$ g anti-CD3 mAb. Isotype-matched controls were included in all cases. Cell death result was determined by the percentage of AnnexinV-binding target cells (BD Pharmingen) using flow cytometry.

### Confocal microscopy

Intracellular colocalization of IL-17 with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , or RORC (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) proteins was studied using a Leica SP5 confocal microscope (Leica Geosystems AG, Sweden).

### RT-PCR and real-time PCR analysis of gene expression in T cells

Ribonucleic acid from the cytoplasm of T cells was obtained from cell lysates using the RNeasy kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and resulting mRNA (1  $\mu$ g) reverse-transcribed to cDNA using the avian myeloblastosis virus-RT system (Promega, Madison, WI, USA). For quantitative PCR, equal amounts of cDNA templates were amplified using the following specific human primer oligonucleotides for RORC: 5' agtcggaagccaagatcaga 3' (forward) and 5' caagagaggttctgggcaag 3' (reverse); for T-bet, 5' ccgtgactgcctaccagaat 3' (forward) and 5' atctcccgaaggaattgac 3' (reverse). The reaction mixture contained 5 ng cDNA, 0.5  $\mu$ M primer, and QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA). Reactions were performed in a LightCycler 480 System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Target gene expression was calculated using the comparative method for relative quantity upon normalization to housekeeping HPRT1 gene expression.

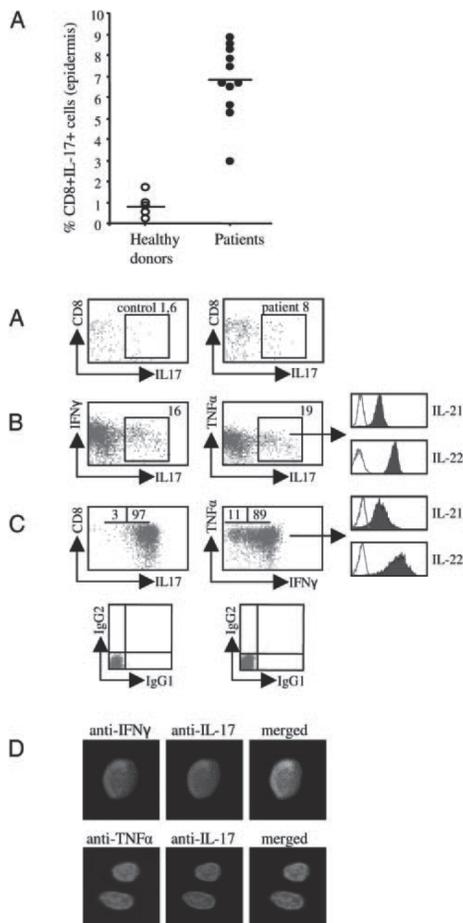
### Statistical analysis

Statistical comparison between groups was performed using the Mann-Whitney test or Wilcoxon test as appropriate, using the SPSS statistical package (Microsoft, USA). *P* values are designated as *P* < 0.05 (\*), *P* < 0.01 (\*\*), and *P* < 0.001 (\*\*\*)

## RESULTS

### Isolation and phenotypical identification of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from the psoriasis plaque

We isolated CD8<sup>+</sup> T cells from psoriasis plaque biopsies to study the phenotypical, molecular, and functional properties that define CD8<sup>+</sup> T cells producing IL-17. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were obtained mainly from epidermis. In freshly isolated T lymphocytes from skin biopsies, our results show that psoriasis patients have an increased population of CD8<sup>+</sup> T cells expressing IL-17 compared with controls (Fig. 1, A and B). A distinctive feature of Th17 cells is their restricted secretion pattern of cytokines, which is confined in almost all cases to IL-17. This is not the case, remarkably, of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells from psoriasis skin, which after 4 days stimulation with CD3/CD28 microbeads, significantly produce IFN- $\gamma$  as well as TNF- $\alpha$  (Fig. 1C, left and middle panels). All CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cells from psoriatic plaques expressed IL-21 and IL-22 (Fig. 1C, right histograms). To confirm the observed pattern of cytokine production of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells from psoriasis skin, T lymphocytes were sorted by means of CCR6 expression and then expanded for 7 days with CD3/CD28. Consistent with our previous observation, most CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells produce TNF- $\alpha$  and a majority also secretes IFN- $\gamma$  (Fig. 1D, left and middle panels). By gating on TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -containing CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells, we confirmed the cosynthesis of IL-21 and IL-22 by the same cells (Fig. 1D, right histograms), which were not detected in CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> cells. Direct observation of cells by confocal microscopy clearly demonstrates the colocalization of IL-17 and TNF- $\alpha$ , as well as IL-17 and IFN- $\gamma$  (Fig. 1E). These intracellular cytokines detected in CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells are secreted efficiently after a



**Figure 1.** (A) Individual percentages of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cells obtained from skin samples of 11 patients (●) and five healthy individuals (○) are shown. Psoriasis patients and donors mean  $\pm$  SD values were 6.9%  $\pm$  1.7% (range, 3–9%) and 0.9%  $\pm$  0.5% (range, 0.4–1.8%), respectively (*P* < 0.05). (B) Expression of IL-17 in freshly isolated CD8<sup>+</sup> T cells from psoriatic and control individuals (a representative experiment of 11 is shown). (C) Coexpression of IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-21, and IL-22 expression on psoriatic CD8<sup>+</sup> cells after 4 days stimulation with antiCD3/CD28-coupled microbeads (a representative experiment of 11 is shown). (D) Cytokine production profile of sorted CD8<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> cells in vitro-expanded for 7 days in the presence of anti-CD3/28 microbeads (a representative experiment out of 11 is shown). (E) IL-17, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  cell colocalization was assessed by confocal microscopy using anti-IL-17-PE/IFN- $\gamma$ -Alexa Fluor 647- and anti-IL-17-PE/anti-TNF- $\alpha$  Alexa Fluor 647-conjugated mAb pairs. One out of four experiments is shown.

# JLB

TCR/CD3-mediated stimulation. **Table 1** shows that IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-21, and IL-22 are found in culture supernatant of cells stimulated with anti-CD3/CD28-coupled beads, suggesting that intracellular production of cytokines may be followed by their release to the environment, likely influencing the plaque's status (formation, maintenance, or inhibition).

Detailed phenotype analyses were carried out to further characterize plaque-derived IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (**Fig. 2**). Results obtained using sorted CD8<sup>+</sup> cells show that all CD8<sup>+</sup> T cells (IL-17<sup>+</sup> or IL-17<sup>-</sup>) obtained from psoriatic patients were TCR $\alpha\beta$  T cells, showing an activated effector/memory phenotype, which includes the expression of CD45RO and lack of CD45RA (**Fig. 2**). IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells share some prominent phenotypical features with Th17 cells, such as the expression of CCR6 and IL-23R, which were not found on IL-17<sup>-</sup> cells. Noteworthy, CD161 is expressed on IL-17<sup>+</sup> cells and not on IL-17<sup>-</sup> cells. NKG2D, a well-known co-stimulatory molecule universally expressed on CD8<sup>+</sup> T cells involved in cytotoxic effector mechanisms, is absent in CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cells derived from psoriasis plaques. This is in sharp contrast with the abundant expression of this receptor found in the converse CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> cells from all psoriatic patients who entered our study. CD103 expression is expressed on IL-17<sup>-</sup> and IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell populations.

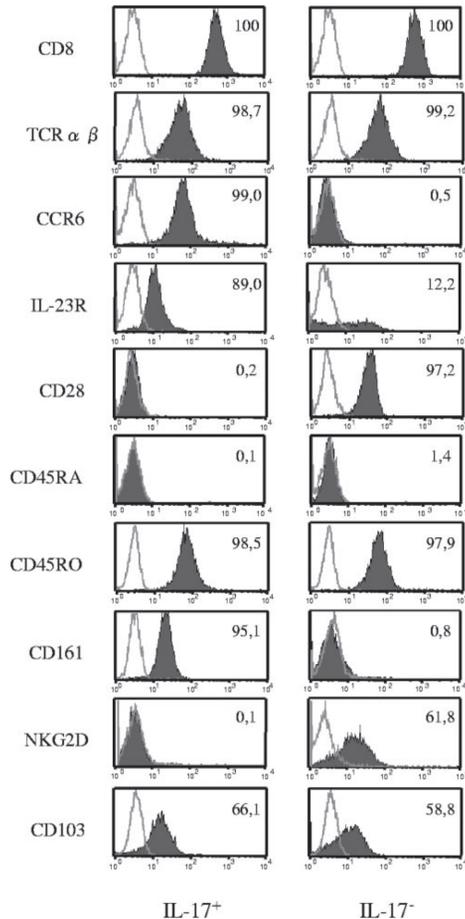
## Transcriptional regulation of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells from psoriasis plaque

Real-time PCR studies were carried out to quantify the expression of the RORC and T-bet transcription factors in CD8<sup>+</sup> cells from psoriasis plaque. **Figure 3A** shows that RORC as well as T-bet transcription factors are up-regulated significantly in CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> cells. The expression of RORC, however, is not up-regulated in CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> cells, which preferentially transcribe T-bet (**Fig. 3A**). We confirmed further that the signal detected in real-time PCR experiments correlates with the presence of the RORC protein within the nucleus by confocal microscopy assays. Our results show that RORC is present in IL-17<sup>+</sup> cells (**Fig. 3B**), and it is not detected in IL-17<sup>-</sup> T lymphocytes (not shown). These patterns of transcription factors

**TABLE 1. Skin-Derived T Cell Cytokines Production (pg/ml)**

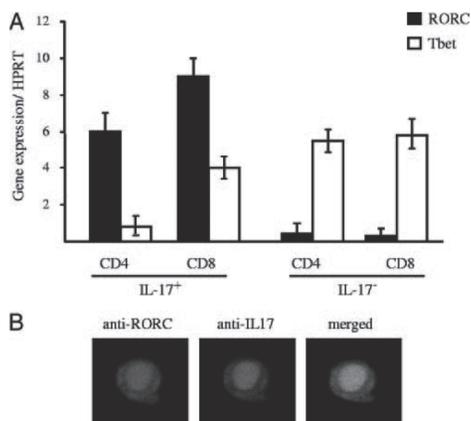
	Psoriasis patients		Healthy donors	
	CD8 <sup>+</sup> IL-17 <sup>-</sup>	CD8 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> IL-17 <sup>-</sup>	CD8 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup>
IL-17	<15	432 $\pm$ 116	<15	225 $\pm$ 87
IL-21	44 $\pm$ 20	611 $\pm$ 122	78 $\pm$ 32	199 $\pm$ 34
IL-22	39 $\pm$ 27	948 $\pm$ 194	67 $\pm$ 52	310 $\pm$ 45
TNF- $\alpha$	810 $\pm$ 83	1015 $\pm$ 130	587 $\pm$ 111	603 $\pm$ 142
IFN- $\gamma$	754 $\pm$ 123	842 $\pm$ 235	661 $\pm$ 149	701 $\pm$ 173

CD8<sup>+</sup> T lymphocytes production of Th1- and Th17-related cytokines. Single-cell suspension from psoriasis ( $n=11$ ) or control ( $n=5$ ) skin samples was expanded for 7 days and then sorted according to CD8<sup>+</sup> and CCR6<sup>+</sup> expression. Resulting populations (CCR6<sup>+</sup> and CCR6<sup>-</sup>) were stimulated for 4 h with PMA plus ionomycin and cytokines determined in the culture supernatants. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE.



**Figure 2. Representative phenotype of IL-17<sup>+</sup> (left) or IL-17<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (right) derived from psoriasis plaque. Open histograms represent isotype controls.**

are similar to those characterizing Th17 cells and Th1 cells, respectively (**Fig. 3A**). The regulation of gene expression of Th17 cells is controlled tightly by IL-12, which decreases the production of IL-17 and enhances IFN- $\gamma$ . Our results show that IL-12 greatly inhibits the number of CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> cells expressing CCR6, IL-17, IL-21, and IL-22, increases the number of cells producing IFN- $\gamma$ , and leaves the percentage of TNF- $\alpha$ -producing cells unaffected (**Fig. 4A**). In addition, the transcription factor RORC but not T-bet was down-regulated by IL-12 (**Fig. 4B**).



**Figure 3.** Expression of RORC and Tbet transcription factor in psoriasis skin-derived CD8<sup>+</sup> T cells, IL-17<sup>+</sup> or IL-17<sup>-</sup>, was analyzed by real-time PCR and results normalized against HPRT housekeeping gene values in each case. Columns represent mean ± sd values of relative expression obtained from eight different patients. CD4<sup>+</sup> T cell values correspond to a Th17 cell line also derived from a psoriatic patient. Columns represent mean ± sd values from eight independent experiments. (B) RORC protein expression was confirmed in IL-17<sup>+</sup> T cells under a confocal microscope using anti-IL-17-PE-conjugated mAb and anti-RORC rabbit anti-human polyclonal antiserum.

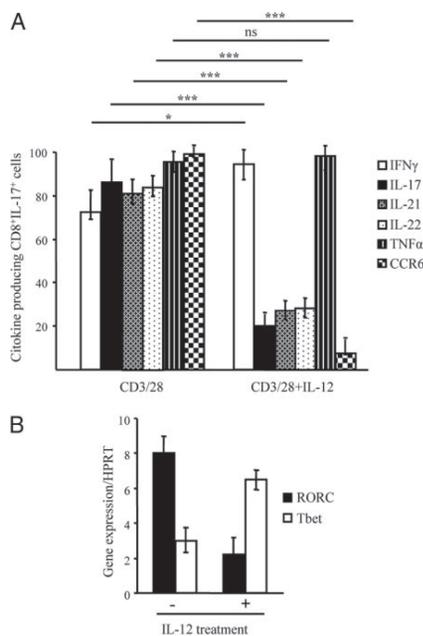
**Functional characterization of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells from psoriasis plaque**

The ability of CD8<sup>+</sup>IL-17-producing T cells derived from psoriasis plaque to proliferate in response to TCR-mediated stimulation was also assessed. For this purpose, CCR6-sorted and expanded cells were challenged with anti-CD3/CD28 mAb, alone or in the presence of indicated cytokines. A well-characterized Th17 line (Fig. 5A, cytometry plot inset) was used as a control. The response of the Th17 cells was similar to those of the CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> T cells derived from the psoriasis plaque. Furthermore, proliferation of the three types of cells in the presence of IL-2, IL-15, or IL-12 was enhanced significantly with respect to their results obtained in the absence of exogenous cytokines. Surprisingly, the addition of TGF-β to the cultures did not inhibit proliferation of the CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells, whereas as expected, it blocked the proliferation of the CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> T cells dramatically, as well as the Th17 cells (Fig. 5A). These results prompted us to ask whether CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells derived from psoriasis patients' skin were refractory to the functional modulation of Tregs. Therefore, proliferation-inhibition assays were carried out to explore the regulatory activities of Tregs isolated from healthy individuals over CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells from psoriasis patients. Remarkably, our results show clearly that this population is resistant to the negative modulation of Tregs, whereas the proliferation of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> cells is inhibited significantly (Fig. 5B).

We next examined if the concurrence of cytokines required for the differentiation process of Th17 cells may influence the

cytokine production profile of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> sorted T cells from psoriasis plaque. Thus, T cells stimulated by CD3/CD28-coupled beads were cultured in polarizing conditions (IL-1 plus IL-6) in the presence or absence of saturating amounts of anti-IFN-γ, anti-IL-4, and anti-IL-2 neutralizing mAb. The number of cells containing IL-17, IFN-γ, or TNF-α was determined 4 days thereafter (Fig. 6). IL-17 production remained unchanged with all combinations used. The percentage of IFN-γ-producing T cells was decreased slightly in cultures containing anti-IFN-γ mAb, and TNF-α-producing T cells remained unaffected in all combinations tested. Interestingly, CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> T cells cultured in the same polarizing conditions were unable to induce de novo production of IL-17.

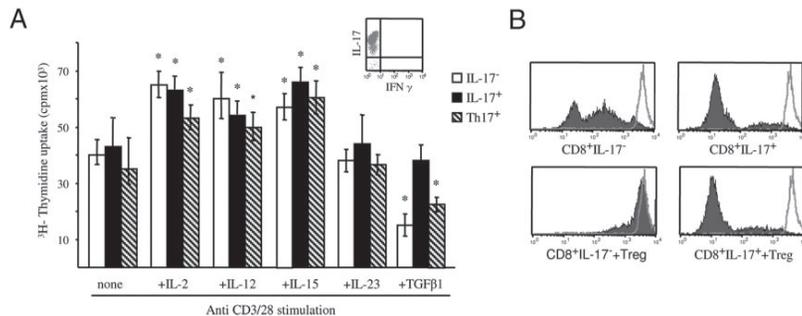
The effect of a neutralizing anti-TNF-α mAb on CD8<sup>+</sup> psoriatic T cells was analyzed, as TNF-α production was not altered by any combination of cytokines used in our study, and Th17-related cytokine serum levels are reduced significantly in patients treated with *etanercept*, a TNF-α antagonist. Interestingly, anti-TNF-α mAb inhibits the expression of the early activation



**Figure 4.** IL-12-mediated down-modulation of IL-17-producing cells from psoriasis patients (n=9). (A) Intracellular IL-17, IL-21, IL-22, IFN-γ, TNF-α, and surface CCR6 expression in psoriasis skin-derived CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> stimulated with anti-CD3/CD28, with or without IL-12 (10 ng/ml) and (B) IL-12 inhibit RORC expression while enhancing Tbet signal in CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells. Columns represent mean values ± sd, and asterisks denote P values (\*, P<0.05; \*\*\*, P<0.001). ns, Not significant.

JLB

**Figure 5. (A) Proliferative response of psoriasis skin-derived CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> T cells and a Th17 cell line (up-right cytometry plot inset). Columns represent mean  $\pm$  SD values ( $n=8$ ) of proliferative response and asterisks, statistical significance ( $^*$ ,  $P<0.05$ ). (B) CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs isolated from peripheral blood of healthy volunteers were cocultured for 5 days with CFSE-labeled skin-derived CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> T cells at a 1:1 ratio, stimulated with CD3/CD28. Proliferation was determined by CFSE fluorescence intensity dilution. Image shows proliferation (filled area). Unfilled area represents CFSE total fluorescence intensity at the stimulation time (24 h after labeling target cells with CFSE). One representative of five independent experiments is shown.**



antigen CD69 as much as 60–80% of that observed in psoriatic T cells in the absence of anti-TNF- $\alpha$  (Fig. 7A). The treatment with the anti-TNF- $\alpha$  mAb reduces IL-17 production significantly (Fig. 7B). Although CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> and IL-17<sup>-</sup> showed decreased expression of CD69 on the cell surface, inhibition was significantly stronger within the CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> compartment, likely indicating a major autocrine TNF- $\alpha$  requirement for CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cell activation compared with CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> T cells.

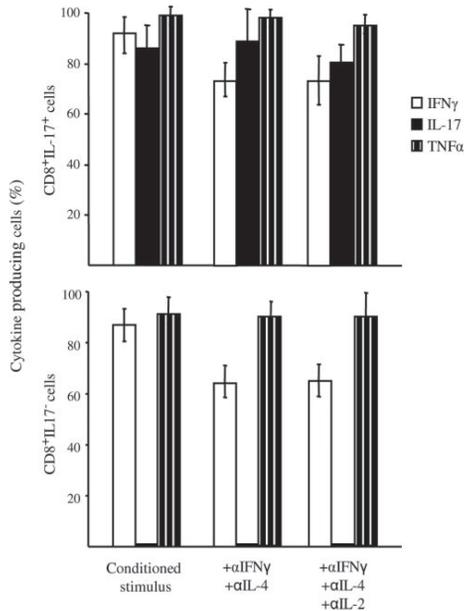
Finally, we studied the cytotoxic ability of CD8<sup>+</sup> T cells from the psoriatic plaque. Annexin V expression was measured on the cell surface of P815 target cells (murine mastocytoma) after being cocultured with effector cells for 4 h at 1:1, 10:1, and 40:1 E:T cell ratios. Anti-CD3-mediated cytotoxicity (redirected lysis) ability was determined. CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells displayed an important, significantly higher capacity to kill target cells than CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> cells, likely indicating that in functional terms, IL-17<sup>+</sup> producer cells might play a role in the control of plaque progression, as they mediate cytolytic events efficiently (Fig. 8).

## DISCUSSION

In this study, we addressed the characterization of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T lymphocytes present in skin lesions of patients with psoriasis. We have shown that psoriasis plaque contains CD8<sup>+</sup> T cells producing IL-17 in significantly higher amounts than in the skin of healthy donors, as it has been reported previously [22]. These cells share with the Th17 population-selective phenotypical features such as the expression of CCR6 and IL-23R. In addition, they also express CD103, which seems to be a requisite for epidermal homing of all CD8<sup>+</sup> cells [23]. All T cells isolated from psoriatic plaques bear a TCR $\alpha\beta$ , and remarkably, we did not find any other types of IL-17-producing cells such as invariant NKT [24] or TCR $\gamma\delta$ -T cells [25], thus suggesting that these populations are not involved in the lesion, or otherwise, they represent negligible proportions that may not be relevant in the pathogenesis of psoriasis, at least in terms of

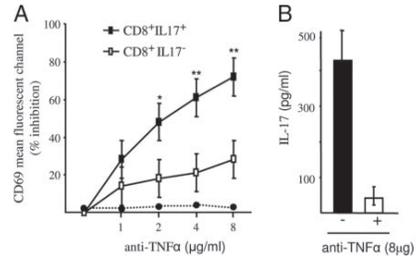
IL-17 production. The pattern of transcription factors found is also comparable with that of Th17 cells, indicating that in CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> and Th17 populations, the transcriptional and control machineries responsible for the expression of IL-17 are conserved throughout the differentiation of the T lymphocyte lineage. In this sense, our data suggest that CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells resemble Th17 cells, and CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> cells behave similarly to Th1 cells. However, a distinctive feature is the expression of the T-bet transcription factor, readily detected in CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells but not in Th17 cells. We believe that it is unlikely that this differential expression could be a result of a minute contamination of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> cells in our isolates, as >98% of the CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells analyzed expressed CCR6, a selective marker of IL-17-producing cells. Interestingly, when IL-12 was added to the CD8<sup>+</sup>CD17<sup>+</sup> cultures, the T-bet gene was clearly up-regulated concomitantly with a significant reduction in the number of cells producing IL-17 cells after stimulation, as it occurs with Th17 human cells [10]. This finding reinforces the idea that the IL-17 gene regulatory mechanisms in CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells are similar to those of Th17.

Remarkably, we have not found CD8<sup>+</sup> cells that produce IL-17 exclusively, as most CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells also make TNF- $\alpha$ , and 40–50% produce IFN- $\gamma$  in colocalization with IL-17. This is a significant difference with Th17 cells, which do not produce TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ . In expanded populations, coexpression of the three cytokines is found in most cells, indicating that the production of cytokines by CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells is actively redundant to that of the CD4<sup>+</sup> T cells present in the plaque, thus reinforcing their relevance in the pathogenesis of the disease. However, CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells isolated from epidermis of healthy controls also synthesize the three cytokines after TCR challenge, supporting that this is a physiological ability rather than a psoriasis-specific alteration. Thus, it is conceivable that CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T lymphocytes are resident T cells “in situ”, polarized to IL-17 production rather than “infiltrating T lymphocytes.” This possibility raises interesting issues, still unraveled, such as where the IL-17-producing cells present in the psoriasis site are generated, as well as how they acquire the potential



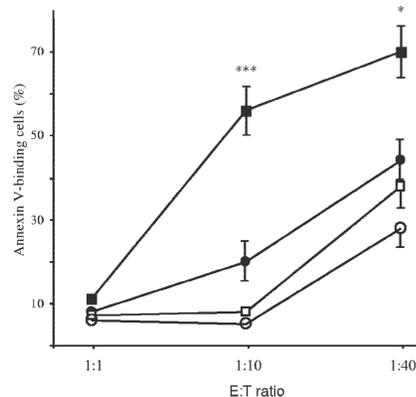
**Figure 6.** Intracellular IFN- $\gamma$ , IL-17, and TNF- $\alpha$  were determined ( $n=9$ ) in (upper) CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cells and (lower) CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> T cells and stimulated for 4 days with anti-CD3/CD28 and IL-1 plus IL-6 (conditioned stimulus) in the presence or absence of anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4, and anti-IL-2 neutralizing mAb. Columns represent mean  $\pm$  sd values of percentage of positive cells for each cytokine and asterisks'  $P$  values with respect to those of the conditioned stimulus (\*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ).

to switch their phenotype depending on the cytokines' milieu at the site of inflammation. In an effort to explore this possibility, we assessed whether CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> cells derived from psoriasis skin lesion could become CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> and vice versa, which is whether CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells could be down-regulated in response to different polarizing conditions. We found that whereas the CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> subset is stable and not susceptible to secrete IL-17, regardless of the treatment, IL-12 induces CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells to down-regulate the production of IL-17 simultaneously to the enhancement of IFN- $\gamma$ . These observations are consistent with previous observations [10] as well as our own data, showing that IL-12 favors rather than inhibits proliferation of IL-17<sup>+</sup> cells. The fact that the number of cells producing TNF- $\alpha$  remains unchanged supports the idea that TNF- $\alpha$  leads a sort of cytokine hierarchy in the development of psoriasis [26, 27]. This is reinforced by our observation that blockade of endogenous TNF- $\alpha$  hinders full activation and IL-17 production of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cells in response to TCR/CD3-mediated stimulation. These results suggest complex cytokine interplays in the maintenance of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells, which



**Figure 7.** Effect of TNF- $\alpha$  blockade on (A) TCR/CD3-dependent T cell activation was determined by the expression of CD69. CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> (■) and CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> T cells (□) were stimulated with anti-CD3/CD28, with or without anti-TNF- $\alpha$  mAb at 1, 2, 4, or 8  $\mu$ g/ $5 \times 10^3$  cells for 6 h and CD69 expression analyzed. Isotype controls are represented (●). Results are expressed as mean  $\pm$  sd values ( $n=9$ ) of percentages of inhibition obtained. Asterisks indicate  $P$  values (\*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ) and (B) IL-17 production by CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells cultured in the presence of anti-TNF- $\alpha$  mAb. Isotype-matched control mAb did not affect IL-17 production (not shown).

seem to be dependent on the absence of IL-12 and on the simultaneous presence of at least TNF- $\alpha$ . It is likely that IL-17<sup>+</sup> cells are generated elsewhere but produce IL-17 only when located in an active inflammation site containing relevant in-



**Figure 8.** Cytotoxic ability of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cells from psoriasis patient and controls (patients: ■; controls: □) and CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> (patients: ●; controls: ○). Effector cells were cocultured with P815 target cells for 4 h. For redirected lysis, P815 cells were preincubated for 30 min with 5  $\mu$ g anti-CD3 mAb and then washed extensively. Redirected lysis was evaluated by the percentage of P815 target cells binding anti-Annexin V mAb by flow cytometry. Data are shown as the mean value of the percentage of Annexin V-expressing P815 cells obtained from nine different patients and five control individuals. Error bars represent sd and asterisks'  $P$  values (\*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ) with respect to those of nonpsoriatic skin-derived T cells.

# JLB

ducer cytokines but lacking IL-17 inhibitory cytokines such as IL-12. According to this model, the production of IL-17 would be the result of a local unbalanced cytokine milieu. Recently, it has been proposed that IL-17<sup>+</sup> cells migrate into the skin toward the CCR6 ligand, CCL20, a molecule that is secreted by myeloid DC. The same study also suggests that IFN- $\gamma$  triggers skin myeloid DC to produce IL-1 and IL-23, which in turn induce IL-17 [22]. However, this model does not explain the fact that not all T cells present in psoriasis plaque are IL-17<sup>+</sup> or the origin of the IL-17<sup>+</sup> cells, i.e., whether the IL-17-producing cells are generated in situ upon interaction with Th1/Th17 cell polarizing myeloid DC that accumulate in psoriasis skin [28] or enter the skin already as IL-17<sup>+</sup> cells after being activated in local or distant lymph nodes.

Regarding the contribution of epidermal CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells to the pathogenesis of psoriasis, we have proved that CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> proliferate and secrete cytokines efficiently in response to CD3/TCR-mediated stimulation and to certain cytokines shown previously to facilitate the proliferation of IL-17<sup>+</sup> cells [29, 30]. The enhanced proliferative response obtained in the presence of IL-12 or IL-15 clearly shows that there are no anergic or tolerized cells. Interestingly, CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells showed little susceptibility to Tregs from peripheral blood. It has been reported previously that human Th17 cells were less sensitive to Tregs than Th1 cells [10], and more recently, autoimmunity in dry eye disease has been shown to be a result of resistance of Th17 cells to Treg suppression in a validated mouse model of the disease [31]. However, it has to be considered that antigen-specific Tregs may render a different outcome. It is noteworthy that in our experiments, TGF- $\beta$  did not inhibit the proliferation of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells, and CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> cell proliferation was reduced significantly. This indicates a possible mechanism of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> to escape Treg control or alternatively, a dual role for this factor depending on the targeted T cell subset [32, 33]. Finally, the possibility that CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> might react less to cocultured Tregs also deserves consideration, as it seems to proliferate much faster than CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> T cells. If this is the cause of their resistance to Tregs, then it would support the idea that within a given population, the number (or ratio) of proliferating cells at the time of Treg contact might be a critical factor to achieve efficient suppression.

The presence in the psoriatic epidermis of CD8<sup>+</sup>IL-17-producing lymphocytes, demonstrated in this study as cytotoxic cells, may suggest a physiological role in the control of keratinocyte growth. The ability of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells derived from psoriasis plaque to kill target cells in a TCR/CD3-dependent manner suggests that their activity in psoriasis epidermis might be to promote the destruction of local tissue to limit keratinocyte growth. This would imply the TCR/CD3-mediated recognition of previously hidden antigens or the destruction of keratinocytes undergoing anomalous differentiation during the stressed growth process in active psoriasis. The marked cognate cytotoxicity of CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells resembles the mechanism responsible for epithelial cell destruction in the mucosa of the small intestine of celiac disease patients after chronic stimulation of CD4<sup>+</sup> cells in the lamina propria by gluten-derived peptides, as we described [34, 35] as well as others [36].

These mechanisms require the coordinate expression of NKG2C and NKG2D CD8<sup>+</sup> T cells in response to IL-15. CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells respond efficiently to IL-15, which is also produced by psoriatic keratinocytes [37, 38], but a similar cytotoxic mechanism can be excluded, as psoriatic CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells lack expression of NKG2C and NKG2D. We also contemplated the possibility that our CD8<sup>+</sup>CD17<sup>+</sup> cells become lymphokine-activated killer cells as a result of other cytokines produced within the cultures. However, addition of anti-IL-2 mAb to the effector cell culture 24 h prior to assays did not prevent cytotoxicity. We are aware that P815 cells used here as target cells are very different from keratinocytes, but functional significance should be considered, as these cells also express CD161, the human homologue of murine NK1.1 [39], expressed on most NK cells, and seem to be a relevant marker for human IL-17-producing cells [40]. Ongoing research is addressing this aspect as well as attempting to define better whether CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> lymphocytes (Tc17 cells) mainly contribute to initiate, stabilize, or inhibit the psoriatic process in the skin.

## ACKNOWLEDGMENTS

Research was supported by Grants SAF2006-09991 from Spanish Ministry of Science and Innovation, 0156/05 from Consejería de Salud Junta de Andalucía (M. S.), and SAF2006-06246 (I. J. M.). We thank Dr. D. Porcel from the Centro de Instrumentación Científica of the University of Granada, Spain, for advice and assistance with confocal experiments and Drs. A. C. Ashley and D. Jaraquemada for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Bowcock, A. M., Krueger, J. G. (2005) Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 699–711.
- Gaspari, A. A. (2006) Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **54**, S67–S80.
- Schon, M. P., Boehncke, W. H. (2005) Psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1899–1912.
- Austín, L. M., Ozawa, M., Kikuchi, T., Walters, J. B., Krueger, J. G. (1999) The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon- $\gamma$ , interleukin-2, and tumor necrosis factor- $\alpha$ , defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 752–759.
- van Beelen, A. J., Teunissen, M. B., Kapsenberg, M. L., de Jong, E. C. (2007) Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **7**, 374–381.
- Loves, M. A., Bowcock, A. M., Krueger, J. G. (2007) Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* **445**, 866–873.
- Loves, M. A., Kikuchi, T., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Zaba, L. C., Haider, A. S., Bowman, E. P., Krueger, J. G. (2008) Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1207–1211.
- Vanden Eijnden, S., Goriely, S., De Wit, D., Willems, F., Goldman, M. (2005) IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human. *Eur. J. Immunol.* **35**, 469–475.
- Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A. D., Schlus, K. S., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M., Dong, C. (2008) T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR  $\alpha$  and ROR  $\gamma$ . *Immunity* **28**, 29–39.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Felli, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudizi, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., Romagnani, S. (2007) Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* **204**, 1849–1861.

11. Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponnath, P., Andrew, D. P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., Wu, L., Butcher, E. C. (1999) The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* **400**, 776–780.
12. Homey, B., Dieu-Nesjean, M. C., Wiesenborn, A., Massacrier, C., Pin, J. J., Oldham, E., Catron, D., Buchanan, M. E., Muller, A., deWaal Malefyt, R., Deng, G., Orozco, R., Ruzicka, T., Lehmann, P., Lebecque, S., Caux, C., Zlotnik, A. (2000) Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3  $\alpha$ /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J. Immunol.* **164**, 6621–6632.
13. Kikly, K., Liu, L., Na, S., Sedgwick, J. D. (2006) The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 670–675.
14. Boniface, K., Guignouard, E., Pedretti, N., Garcia, M., Delwail, A., Bernard, F. X., Nau, F., Guillet, G., Dagrégorio, G., Yssel, H., Lecron, J. C., Morel, F. (2007) A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **150**, 407–415.
15. Zheng, Y., Danilenko, D. M., Valdez, P., Kasman, L., Eastham-Anderson, J., Wu, J., Ouyang, W. (2007) Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* **445**, 648–651.
16. Caproni, M., Antiga, E., Melani, L., Volpi, W., Del Bianco, E., Fabbri, P. (2008) Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: a randomized-controlled trial. *J. Clin. Immunol.*
17. Piskin, G., Sylva-Steenland, R. M., Bos, J. D., Teunissen, M. B. (2006) In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J. Immunol.* **176**, 1908–1915.
18. Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Harrington, L. E. (2007) IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 821–852.
19. Christophers, E. (2008) Explaining phenotype heterogeneity in patients with psoriasis. *Br. J. Dermatol.* **158**, 437–441.
20. Visser, W. H., Arndtz, C. H., Muis, L., Van Erp, P. E., de Jong, E. M., van de Kerkhof, P. C. (2004) Memory effector (CD45RO<sup>+</sup>) and cytotoxic (CD8<sup>+</sup>) T cells appear early in the margin zone of spreading psoriatic lesions in contrast to cells expressing natural killer receptors, which appear late. *Br. J. Dermatol.* **150**, 852–859.
21. Hammar, H., Gu, S. Q., Johannesson, A., Sundkvist, K. G., Biberfeld, P. (1984) Subpopulations of mononuclear cells in microscopic lesions of psoriatic patients. Selective accumulation of suppressor/cytotoxic T cells in epidermis during the evolution of the lesion. *J. Invest. Dermatol.* **83**, 416–420.
22. Kryczek, I., Bruce, A. T., Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Aphale, A., Vatan, L., Szeliga, W., Wang, Y., Liu, Y., Welling, T. H., Elder, J. T., Zou, W. (2008) Induction of IL-17<sup>+</sup> T cell trafficking and development by IFN- $\gamma$  mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J. Immunol.* **181**, 4733–4741.
23. Conrad, C., Boyman, O., Tonel, G., Tun-Kyi, A., Laggner, U., de Fougères, A., Kotliński, V., Gardner, H., Nestle, F. O. (2007)  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 Integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nat. Med.* **13**, 836–842.
24. Michel, M. L., Keller, A. C., Paget, C., Fujio, M., Trottein, F., Savage, P. B., Wong, C. H., Schneider, E., Dy, M., Leite-de-Moraes, M. C. (2007) Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J. Exp. Med.* **204**, 995–1001.
25. Shibata, K., Yamada, H., Hara, H., Kishihara, K., Yoshikai, Y. (2007) Resident V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma$  $\delta$  T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J. Immunol.* **178**, 4466–4472.
26. Haider, A. S., Cohen, J., Fei, J., Zaba, L. C., Cardinale, I., Toyoko, K., Ott, J., Krueger, J. G. (2008) Insights into gene modulation by therapeutic TNF and IFN $\gamma$  antibodies: TNF regulates IFN $\gamma$  production by T cells and TNF-regulated genes linked to psoriasis transcriptome. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 655–666.
27. Haider, A. S., Lowes, M. A., Suarez-Farinas, M., Zaba, L. C., Cardinale, I., Khatcherian, A., Novitskaya, I., Wittkowski, K. M., Krueger, J. G. (2008) Identification of cellular pathways of “type 1,” Th17 T cells, and TNF- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of cyclosporine A in psoriasis. *J. Immunol.* **180**, 1913–1920.
28. Zaba, L. C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N. J., Abello, M. V., Novitskaya, I., Pierson, K. C., Gonzalez, J., Krueger, J. G., Lowes, M. A. (2009) Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 79–88.
29. Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R. B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E. M., O’Shea J. J. (2007) Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* **26**, 371–381.
30. Cho, M. L., Ju, J. H., Kim, K. W., Moon, Y. M., Lee, S. Y., Min, S. Y., Cho, Y. G., Kim, H. S., Park, K. S., Yoon, C. H., Lee, S. H., Park, S. H., Kim, H. Y. (2007) Cyclosporine A inhibits IL-15-induced IL-17 production in CD4<sup>+</sup> T cells via down-regulation of PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B. *Immunol. Lett.* **108**, 88–96.
31. Chauthan, S. K., El Annan, J., Ecoiffier, T., Goyal, S., Zhang, Q., Saban, D. R., Dana, R. (2009) Autoimmunity in dry eye is due to resistance of Th17 to Treg suppression. *J. Immunol.* **182**, 1247–1252.
32. Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S. I., Hupe, P., Barillot, E., Soumelis, V. (2008) A critical function for transforming growth factor- $\beta$ , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat. Immunol.* **9**, 650–657.
33. Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M., Ivanov, I. I., Min, R., Victora, G. D., Shen, Y., Du, J., Rubisov, Y. P., Rudenski, A. Y., Ziegler, S. F., Littman, D. R. (2008) TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function. *Nature* **453**, 236–240.
34. Romero, P., Ortega, C., Palma, A., Molina, I. J., Pena, J., Santamaria, M. (2001) Expression of CD94 and NKG2 molecules on human CD4<sup>+</sup> T cells in response to CD3-mediated stimulation. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 219–224.
35. Ortega, C., Romero, P., Palma, A., Orta, T., Pena, J., Garcia-Vinuesa, A., Molina, I. J., Santamaria, M. (2004) Role for NKG2A and NKG2C surface receptors in chronic CD4<sup>+</sup> T-cell responses. *Immunol. Cell Biol.* **82**, 587–595.
36. Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T. N., Raulat, D. H., Lanier, L. L., Groh, V., Spies, T., Ebert, E. C., Green, P. H., Jabri, B. (2004) Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* **21**, 357–366.
37. Ruckert, R., Asadullah, K., Seifert, M., Budagian, V. M., Arnold, R., Trombetta, C., Paus, R., Bulfone-Paus, S. (2000) Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis? *J. Immunol.* **165**, 2240–2250.
38. Villadsen, L. S., Schurman, J., Beurskens, F., Dam, T. N., Dagnaes-Hansen, F., Skov, L., Rygaard, J., Voorhorst-Ogink, M. M., Gerritsen, A. F., van Dijk, M. A., Parren, P. W., Baadsgaard, O., van de Winkel, J. G. (2003) Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J. Clin. Invest.* **112**, 1571–1580.
39. Lanier, L. L., Chang, C., Phillips, J. H. (1994) Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J. Immunol.* **153**, 2417–2428.
40. Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G., Querci, V., Abbate, G., Angelini, R., Berrino, L., Fambirini, M., Caproni, M., Tonelli, F., Lazzari, E., Parronchi, P., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. (2008) Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell precursor. *J. Exp. Med.* **205**, 1903–1916.

## KEY WORDS:

IL-21 · IL-22 · Tc17 cells



## Characterization of Gliadin-Specific Th17 Cells from the Mucosa of Celiac Disease Patients

Silvia Fernández, MSc<sup>1</sup>, Ignacio J. Molina, MD, PhD<sup>2</sup>, Pilar Romero, MD, PhD<sup>1</sup>, Rafael González, MD, PhD<sup>3</sup>, José Peña, MD, PhD<sup>1,3</sup>, Francisco Sánchez, MD<sup>4</sup>, Fernanda R. Reynoso, MD<sup>1</sup>, Juan L. Pérez-Navero, MD, PhD<sup>4</sup>, Orlando Estevez, MD<sup>3</sup>, Consuelo Ortega, MD, PhD<sup>1,\*</sup> and Manuel Santamaría, MD, PhD<sup>1,3,\*</sup>

**OBJECTIVES:** Celiac disease (CD) is a disorder characterized by a deregulated immune response to ingested wheat gluten and related cereal proteins in susceptible individuals. It has been considered that the onset of CD is mediated by a skewed Th1 response. However, the participation of Th17 cells in the pathogenesis of the disease, a key cell population in other autoimmune disorders, has not been studied in detail. We have investigated the presence of Th17 cells in the mucosa of active CD patients and their functional implications in the pathogenesis of the disease.

**METHODS:** T cells obtained from duodenum biopsies from 15 untreated patients and 11 control individuals were characterized by flow cytometry, immunoassays, and real-time PCR.

**RESULTS:** We found gliadin-specific CD4<sup>+</sup> interleukin (IL)-17A-producing T cells in the mucosa of CD patients with a phenotype consisting of TCR (T-cell receptor) $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> (C-C chemokine receptor type 6) and IL-23R<sup>+</sup>. Functional analysis showed that Th17 cells from CD patients are different from those of control individuals in terms of cytokines production. Th17 cells from CD patients, but not from controls, simultaneously express transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ). Th17 CD cells also produce interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL-21, and IL-22. The analysis of the transcription factors revealed a high expression of interferon regulatory factor-4 as a feature of gliadin-specific cells from CD patients with respect to controls.

**CONCLUSIONS:** Gliadin-specific Th17 cells are present in the mucosa of CD patients having a dual role in the pathogenesis of the disease as they produce proinflammatory cytokines (such as IL-17, IFN $\gamma$ , IL-21), mucosa-protective IL-22, and regulatory TGF $\beta$ , which actively modulates IL-17A production by T cells in the celiac mucosa.

*Am J Gastroenterol* advance online publication, 4 January 2011; doi:10.1038/ajg.2010.465

### INTRODUCTION

Celiac disease (CD) is a disorder characterized by a deregulated immune response to ingested wheat gluten and related cereal proteins in susceptible individuals (1,2). It has been considered that the onset of CD is mediated by a skewed Th1 response (3) because of the cytokine secretion profile detected in the intestinal mucosa. This is further supported by the transcription factor pattern found in peripheral T lymphocytes from

patients with CD (4) and the effector mechanisms leading to microvillus atrophy of the mucosa (5).

However, a more complex picture of the ongoing T cell-produced cytokine interplay in the CD mucosa is emerging. This is supported by the coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines by intestinal T cells from CD patients and the presence in the CD mucosa of antigen-specific T-regulatory (Treg) cells (6–8). Indeed, recent evidence suggests that some cell

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Universidad de Granada, Granada, Spain; <sup>3</sup>Servicio de Inmunología Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain; <sup>4</sup>Servicio de Pediatría Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain. **Correspondence:** Manuel Santamaría, MD, PhD, Unidad de Inmunología, Colonia de San José 1, Campus Universitario de Rabanales, Universidad de Córdoba, Córdoba 14071, Spain. E-mail: msantamaria@uco.es

\*Author sharing credit for senior authorship.

This paper is dedicated to the memory of Dr Julián Santamaría, pediatrician, who cared for CD patients in a land and a time when bread withdrawal was not a solution but a sin.

Received 30 March 2010; accepted 26 October 2010

2 Fernández et al.

populations other than Th1 lymphocytes have a significant influence on the pathogenesis of autoimmune responses, as is the case of Th17 cell sub-population (9). The participation of Th17 cells in experimental and human autoimmune disorders has widened the actors to be considered in the immunopathogenesis of CD (9,10). It is known that Th17 cells belong to a separate lineage of T lymphocytes displaying differential features from Th1 or Th2 subtypes of T lymphocytes. These differences include the transcription factors required for interleukin (IL)-17A production and the profile of cytokines produced by these cells, the expression of IL-23 receptor and C-C chemokine receptor type 6 (CCR6), a molecule that has also recently been found to be present on the surface of Treg cells (11). The production of IL-17A in humans is mainly dependent on the expression of the orphan nuclear receptor transcription factor, RORC (12). The cytokine profile of Th17 cells comprises various factors such as IL-21, which is also produced by Th2 cells (13), and IL-22, a cytokine involved in early defense mechanisms against some bacterial pathogens in epithelial tissues (14,15).

The differentiation of naive CD4<sup>+</sup> into Th17 cells is controlled by proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  and IL-6, as well as transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) (16). TGF $\beta$  is a pleiotropic cytokine abundantly present in the intestinal mucosa (17) where it is secreted by CD4<sup>+</sup> T cells (6) and by some intraepithelial CD8<sup>+</sup> lymphocytes (18). The essential role of TGF $\beta$  in the regulation of the intestinal immune response and in the maintenance of regional homeostasis was demonstrated by facts that TGF $\beta$ -deficient mice have severe autoimmunity (19) and that blockade of TGF $\beta$  abrogates the protective activity of Treg cells against colitis observed in a cellular transfer model (20).

Despite the fact that IL-17A-producing T cells (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) have a prominent role in the pathogenesis of autoimmune diseases (21,22), their presence in the small intestine mucosa of CD patients remains largely unexplored. Recent reports have identified cytokine transcripts in duodenal biopsies from CD that follow a pattern consistent with the presence of Th1 and Th17 cells (23,24). However, this indirect evidence has not clarified the relative participation of those cell populations in the pathogenesis of the disease. Therefore, we decided to investigate the presence and functional features of Th17 cells obtained from intestinal explants of untreated celiac patients.

Our results demonstrate the presence of gliadin-specific IL-17A-producing T cells in the duodenum of CD patients. These cells express CCR6, CD161, and IL-23R, show upregulated expression of RORC and interferon regulatory factor-4 (IRF4) transcription factors, and secrete IL-21 and very high levels of IL-22. Remarkably, Th17 cells from CD patients produce TGF $\beta$ , which regulates IL-17A production through an RORC- and IRF4-dependent mechanism.

## METHODS

### Patients and controls

Distal duodenum biopsies were obtained during upper gastrointestinal endoscopy from 15 CD patients undergoing diagnostic protocols (age range 4–13 years); 7 patients were females and 8 males. We obtained control samples from 11 non-CD individuals under-

going biopsies for screening procedures for abdominal symptoms (age range 4–15 years); 4 non-CD individuals were females and 7 males. The CD diagnosis was established based on clinical symptoms, the presence of anti-transglutaminase IgA antibodies, and the histological evidence of total or partial villous atrophy. Human leukocyte antigen (HLA)-class I (PCR-SSP, Invitrogen, Brown Deer, WI) and HLA-class II (PCR-SSO, Innogenetics, Gent, Belgium) high-resolution typing was studied in all patients and in non-CD individuals and their results are shown in **Table 1**. All samples were obtained after informed consent in accordance with the regulations and previous approval of the Institutional Review Board of the Reina Sofía University Hospital. All patients participating in our study were untreated and had never received any specific treatment.

### Immunoselection and culture of cells

Biopsies typically consisted of three to four mucosal explants obtained from each patient and non-CD individuals. Tissue explants were independently digested with 1 mg/ml collagenase A for 1 h at 37 °C. Cells obtained from the explants of each individual were pooled and either used for intracellular cytokine staining assays or stimulated with 100  $\mu$ g/ml transglutaminase-treated peptic-tryptic-gliadin, hereafter gliadin (Sigma, St Louis, MO), in the presence of 1 $\times$ 10<sup>6</sup> irradiated (3,500 rads) autologous peripheral blood mononuclear cells for an additional 7 days. Cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 100 Units/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin (all from Life Technologies, Chagrin Falls, OH) supplemented with 5% human serum (complete medium) in the absence of exogenous cytokines. Expanded cells were depleted of the CD8<sup>+</sup> population by positive CD8 immunoselection with appropriate immunobeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), and the negative fraction, consisting of >93% CD4<sup>+</sup> cells, was further separated using CCR6 immunobeads (Miltenyi). A total of 1.5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells from both positive and negative fractions (CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>) were used to determine their intracellular IL-17A expression (CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> >93% IL-17A; CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> <2% IL-17A<sup>+</sup>). The remaining cells from each fraction were further expanded in the presence of gliadin (CD patient cells) or anti-CD3/CD28-coated beads (cells from non-CD individuals) (human T-Expander CD3/CD28; Invitrogen Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway) at 3 beads/cell in the presence of 20 ng/ml of IL-23 (eBioscience, San Diego, CA). Exogenous IL-23 was removed from cultures 72 h before experiments.

### Flow cytometry

For direct immunofluorescence staining, cells were incubated with fluorochrome-conjugated antibodies on ice for 30 min in the dark and washed twice before analysis. fluorescein isothiocyanate-, Alexa-Fluor 647-, phycoerythrin-, antigen presenting cell (APC)-, or phycoerythrin-Cy7-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) against CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA, CD45RO, anti-interferon- $\gamma$  (anti-IFN $\gamma$ ), anti-TGF $\beta$ , IL-4, IL-10, and isotype-matched irrelevant control mAbs were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Antibodies against TCR (T-cell

Table 1. High-resolution HLA genotype of CD patients and non-CD control individuals participating in the study

Individual	HLA-A*	HLA-C*	HLA-B*	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*
CD-1	0201, 2501	0303, 0701	0801, 1501	0301, 1102	0201, 0301
CD-2	0301, 3002	0501, 0702	0702, 1801	0301, 1501	0201, 0602
CD-3	2301, 2601	0401, 1203	3801, 4403	0301, 1301	0201, 0603
CD-4	0201, 2402	0304, 1502	1501, 5101	0301, 0401	0201, 0302
CD-5	0201, 1101	0401, 0701	1801, 3501	0401, 1104	0301, 0302
CD-6	3002, 2902	0501, 1601	1801, 4403	0301, 0404	0201, 0301
CD-7	2301, 2902	0701, 1601	4403, 4901	0701, 1101	0202, 0301
CD-8	0301, 3101	0401, 0501	3501, 4402	0101, 0301	0201, 0501
CD-9	2402, 3002	0202, 0702	0702, 1503	0301, 1301	0201, 0603
CD-10	2301, 3301	0401, 0602	4403, 4501	0301, 0701	0201, 0202
CD-11	0101, 0201	0602, 0701	0801, 5701	0301, 0701	0201, 0303
CD-12	3001, 3201	0401, 0602	1302, 3503	0301, 0701	0201, 0202
CD-13	0101, 0201	0701, 0202	0801, 2705	0301, 1001	0201, 0501
CD-14	2902, 6802	1601, 0602	4403, 5001	0701, 1104	0202, 0301
CD-15	0201, —	0501, 0701	0801, 1801	0301, —	0201, —
Non-CD-1	0201, 6802	0701, 1203	3801, 4901	0405, 1301	0302, 0603
Non-CD-2	0201, 2902	0602, 1601	4403, 5701	1302, 1501	0602, 0604
Non-CD-3	0301, 2402	0702, —	0702, —	0402, 1104	0301, 0302
Non-CD-4	0201, 0301	0202, 0702	0702, 5101	0701, 1501	0202, 0602
Non-CD-5	0102, 3201	0802, 1505	0702, 1402	0102, —	0501, —
Non-CD-6	0201, 3002	0701, 1203	3801, 4101	0301, 1301	0201, 0603
Non-CD-7	2402, —	0701, 1601	1801, 4403	1102, 1501	0301, 0602
Non-CD-8	0301, 1101	0302, 0701	4901, 5801	0405, 1401	0302, 0503
Non-CD-9	0301, 2902	0102, 1601	4403, 5101	0701, 1101	0202, 0301
Non-CD-10	0201, 3002	0701, 1402	0801, 5101	0301, 0701	0201, 0202
Non-CD-11	2902, 3301	0802, 1601	1402, 4403	0102, 0701	0202, 0501

CD, celiac disease; HLA, human leukocyte antigen.

receptor) $\alpha\beta$  and TCR $\gamma\delta$  were obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA). Antibodies to CCR6 and IL-23 receptors were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN), and the anti-Foxp3 staining set was purchased from eBioscience. The following anti-human antisera and mAbs were also used: anti-RORC, anti-IRF4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-IL-22 (R&D Systems), and anti-IL-17A and anti-IL-21 (eBioscience). Mouse IgG1, IgG2, and rat IgG1 (BD Biosciences) were used as isotype-matched controls. For intracellular staining, cells were activated with 40 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1  $\mu$ g/ml ionomycin (Sigma) for 6 h at 37°C in the presence of brefeldin A before being stained, fixed, and permeabilized using the BD Golgi plus cytofix/cytoperm kit according to the manufacturer's protocol (BD Pharmingen); non-activated controls, treated only with brefeldin A, were included in the assays. Flow cytometry was performed on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed using the FACS Diva software.

#### Cytokine analysis

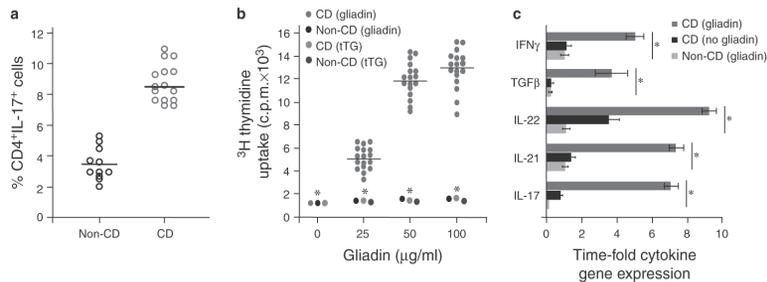
T cells were stimulated with gliadin (50  $\mu$ g/ml) or anti-CD3/CD28-coated microbeads (3 beads/cell) (Invitrogen Dynal Biotech ASA). After culture for 24 h at 37°C, supernatants were collected and stored at -80°C until used. Secreted IL-17A and IFN $\gamma$  were determined using a human Cytokine/Chemokine Multiplex Immunoassay (Linco Research, St Charles, MO), and IL-21 and IL-22 using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Bender Medsystems, Vienna, Austria) following the manufacturer's instructions. TGF $\beta$  levels in culture supernatants were detected using a Quantikine Human TGF $\beta$  ELISA (R&D Systems) according to the manufacturer's protocol.

#### Gliadin specificity assays

Gliadin specificity of IL-17A-producing T cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) from CD patients was assayed by challenging cells with gliadin (25, 50, or 100  $\mu$ g/ml) for 5 days. Native transglutaminase (Sigma)

4 Fernández et al.

COLON/SMALL BOWEL



**Figure 1.** Gliadin-specific CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> lymphocytes are present in the duodenal mucosa of CD patients. **(a)** Individual percentages of CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> cells obtained upon digestion of duodenal biopsies from CD patients (red empty circles;  $n=15$ ) and non-CD control subjects (black empty circles;  $n=11$ ). Mean  $\pm$  s.d. values were  $8.7 \pm 2.4\%$  for CD patients and  $3.6 \pm 1.6\%$  for non-CD control individuals ( $P < 0.05$ ). **(b)** Biopsies-derived fresh T cells from CD patients (red solid circles;  $n=12$ ) and non-CD control individuals (black solid circles;  $n=7$ ) were tested for gliadin specificity by challenging the cells for 5 days with indicated amounts of gliadin and pulsed with <sup>3</sup>H-thymidine to determine cell proliferation. Circles represent values obtained from each individual. T cells from CD patients (green circles) and controls (purple circles) were also tested in the presence of transglutaminase alone (tTG). Circles represent the mean proliferation value obtained in the experiments. **(c)** Cytokine signature of mucosal T cells from CD patients measured by qPCR in the presence (red bars) or absence (black bars) of gliadin (50  $\mu$ g/ml) and from non-CD control individuals in the presence of gliadin (gray bars) in the same conditions as indicated in panel b. Results were normalized against values of the *HPRT1* gene and expressed as time-fold induction (mean  $\pm$  s.d.;  $n=10$ ); \* $P < 0.01$ . CD, celiac disease; IL, interleukin; qPCR, quantitative PCR.

at the concentrations indicated above was used in the experiments as control. Cells were cultured in complete media, pulsed for the final 16 h of culture with 0.5  $\mu$ Ci/well of <sup>3</sup>H-thymidine (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA), harvested, and <sup>3</sup>H-thymidine uptake measured by liquid scintillation counting (Betaplate 1205, Perkin-Elmer, Wellesley, MA).

#### Real-time PCR assays

Cytoplasmic RNA from T cells was extracted using the RNeasy Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and reverse transcribed using the AMV-reverse transcription system (Promega, Madison, WI). For quantitative PCR experiments, equal amounts of cDNA templates were amplified. The specific primers pairs used were as follows: RORC: 5'-AGTCGGAAGGCAAGATCAGA-3' (forward) and 5'-CAAGAGAGGTTCTGGGCAAG-3' (reverse); T-bet: 5'-CCGTGACTGCCTACCAGAAT-3' (forward) and 5'-ATCTCCCCAAGGAATTGAC-3' (reverse); IRF4: 5'-GTCCTGAGCGAAAACAGGAG-3' (forward) and 5'-ACCCAA GACTCCACAGTTG-3' (reverse); IFN $\gamma$ : 5'-TTCAGCTCTGCATCGTTT-3' (forward) and 5'-TCTTTGGATGCTC TGGTCA-3' (reverse); TGF $\beta$ : 5'-AAGTGGACATCAACGGGTTC-3' (forward) and 5'-GTCCTTGGGGAAGTCAATGT-3' (reverse); IL-17A: 5'-CCCCAGTTGATTGGAAGAAA-3' (forward) and 5'-GAGGACCTTTTGGGATTGGT-3' (reverse); IL-21: 5'-GGCAACATGGAGAGGATTGT-3' (forward) and 5'-AAGCAGAAAAGCTGACCA-3' (reverse); IL-22: 5'-CTCCTTCTTGGCCCTCTT-3' (forward) and 5'-GTTTCAGCACCTGCTTCATCA-3' (reverse); *HPRT1*: 5'-ACCCACGGAAGTGTGGATA-3' (forward) and 5'-AAGCAGATGGCCACAGA-3' (reverse). The reactions were performed in a LightCycler 480 system (Roche, Indianapolis, IN). An initial denaturation step at 95  $^{\circ}$ C for 15 min was carried out followed by 35 cycles of 94  $^{\circ}$ C

for 20 s, 60  $^{\circ}$ C for 30 s, and 72  $^{\circ}$ C for 30 s. The expression of target genes was calculated using the comparative method for total quantity upon normalization to *HPRT* gene expression.

#### Statistics

Comparisons between groups were performed by means of the Wilcoxon test or the Mann-Whitney test, as appropriate. Differences were considered as statistically significant for  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Isolation and identification of duodenal Th17 lymphocytes from CD patients

To determine whether Th17 cells are present in duodenum explants of CD patients, freshly obtained T cells were double stained for CD4 and IL-17A and their expression was analyzed by flow cytometry. Our results show that CD patients have an increased population of IL-17A-containing CD4<sup>+</sup> T cells ( $8.7 \pm 2.4\%$ ) than do controls ( $3.6 \pm 1.6\%$ ) (Figure 1a). It is well known that pathogenic T cells from the mucosa of CD patients recognize gliadin in the context of HLA-DQ2 or DQ8 (25). Therefore, we stimulated cells with transglutaminase-treated peptic-tryptic-gliadin by overnight loading of the peptide onto irradiated peripheral blood mononuclear cells pooled from four different HLA-DQ2<sup>+</sup> healthy donors. For this purpose, peripheral blood mononuclear cells from donors were pooled and gliadin added at the indicated concentrations overnight before co-culture for 5 days. We found that T cells from CD patients vigorously proliferated in response to gliadin in a dose-response manner (Figure 1b, red circles), whereas proliferation of cells obtained from non-CD individuals was confined to background levels (Figure 1b, black circles). By contrast, presentation of gliadin by HLA-DQ2<sup>-</sup> cells did not elicit

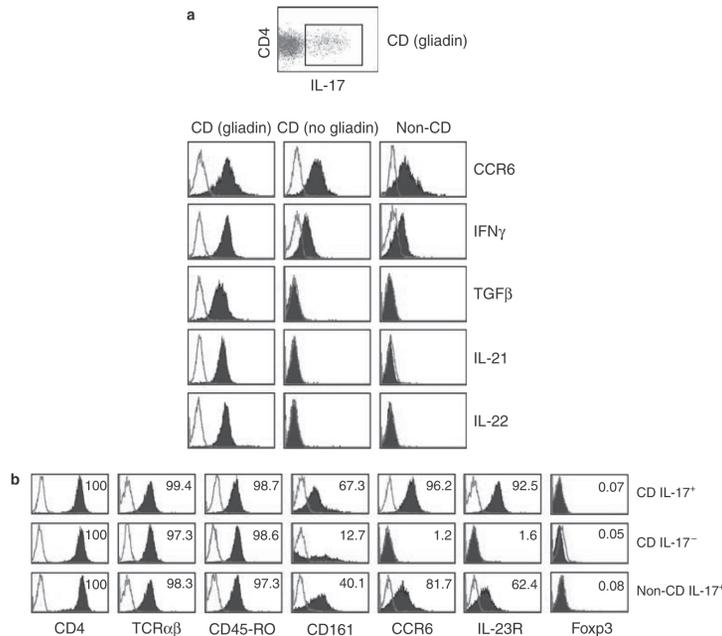


Figure 2. Phenotype of Th17 CD lymphocytes. (a) Representative flow-cytometric analysis on gated CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> duodenal cells from CD patients and control individuals of CCR6, IFN $\gamma$ , IL-21, IL-22, and TGF $\beta$  expression, in the presence or absence of gliadin (50  $\mu$ g/ml). (b) Representative phenotype of IL-17A<sup>+</sup> cells from CD patients (upper panel), IL-17A<sup>-</sup> cells from CD patients (middle panel), and IL-17A<sup>+</sup> cells from control individuals (lower panel). CD, celiac disease; CCR6, C-C chemokine receptor type 6; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL, interleukin; TGF $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ .

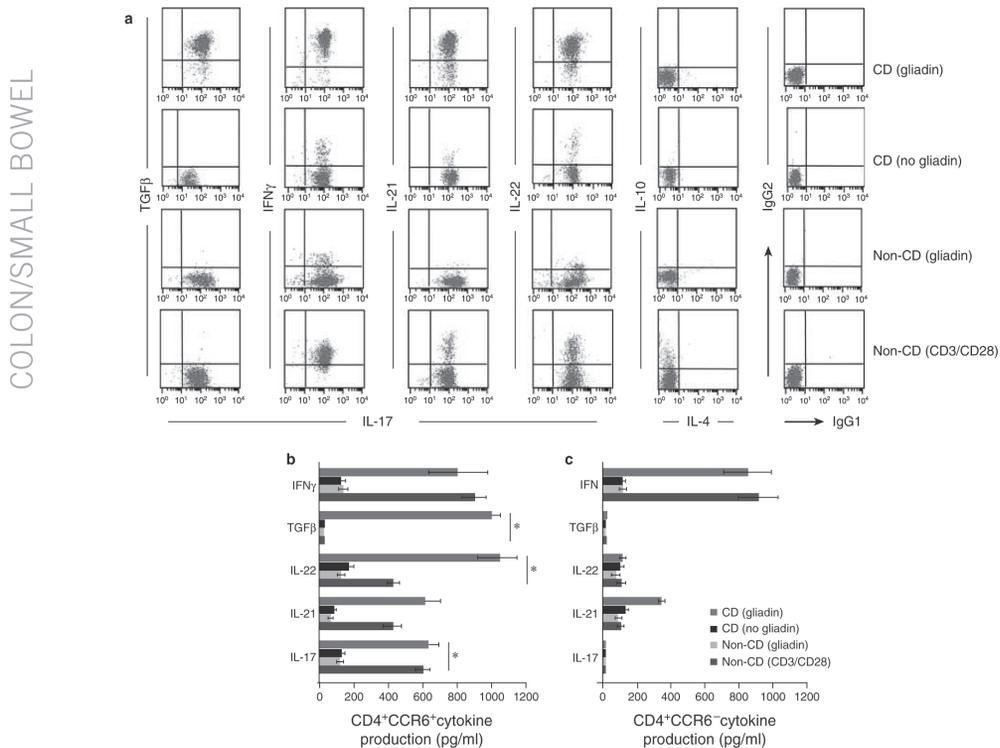
any proliferation of cells from either CD patients or normal individuals. *In vitro* stimulation with tissue transglutaminase did not induce proliferation of T cells derived from either non-CD or CD duodenal biopsies when presented by HLA-DQ2<sup>+</sup> cells (Figure 1b, green and purple circles), thereby supporting the specificity of the response to gliadin by T cells from CD patients.

The cytokine signature of the responding T-cell population was also analyzed by quantitative PCR. We found a signature profile in CD patients' T cells mainly consisting of IFN $\gamma$ , IL-17, IL-21, IL-22, and TGF $\beta$ , whereas the major cytokines detected in non-CD individuals were IFN $\gamma$ , IL-21, and IL-22 (Figure 1c). These results were confirmed by analysis of the protein expression of these cytokines in fresh populations upon gliadin stimulation by means of intracellular staining and flow cytometry. Our results showed that, when gating on the IL-17A-producing cell sub-population (Figure 2a), all the aforementioned cytokines were found in gliadin-stimulated T cells, which also expressed CCR6 (Figure 2b). Non-CD T cells showed a different pattern of cytokine expression upon stimulation with anti-CD3/CD28-coupled beads.

The cell isolates were stimulated *in vitro* for 7 days with gliadin in the presence of HLA-DQ2<sup>+</sup> feeder cells, and the

expanded cells were sorted to obtain a CD4<sup>+</sup> population based on negative immunoselection, followed by a fractioning based on the CCR6 expression. The resulting population (>93% CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>) was further cultured for 7 days with either gliadin (CD) or anti-CD3/CD28-coupled beads (non-CD individuals) and their phenotypical and functional characteristics were analyzed. Th17<sup>+</sup> expanded cells from CD patients showed the widespread surface expression of TCR $\alpha\beta$ , CD45RO, CD161, CCR6, and IL-23R (Figure 2b, upper panels). By contrast, the comparison between IL-17A<sup>+</sup> and IL-17A<sup>-</sup> populations evidenced that CCR6 and IL-23R expressions were only found in IL-17A-producing cells, whereas CD161 was found in both IL-17A<sup>+</sup> (52–76% of cells), and to a lower extent in, IL-17A<sup>-</sup> (12–23%) duodenum-derived T cells (Figure 2b, middle panels). No phenotypical differences appeared between IL-17A<sup>+</sup> T cells from CD and non-CD control individuals (Figure 2b, lower panels). The expression of Foxp3 was analyzed in both CD- and non-CD-derived cells to explore the possibility that the cells could be in a transition state between Tregs and Th17. We found that this molecule is absent in all cells studied (Figure 2b).

6 Fernández et al.



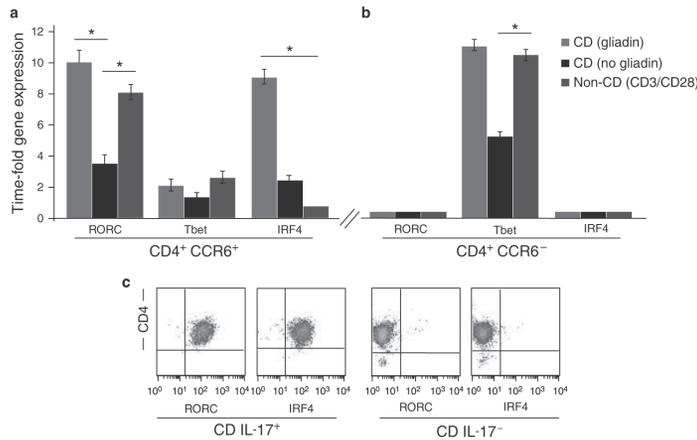
**Figure 3.** Cytokine production of CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> cells from CD patients in response to gliadin stimulation. **(a)** Intracellular cytokines analysis of CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-sorted cells either resting or gliadin stimulated (50 μg/ml) from CD patients (upper panels) and control subjects treated with gliadin or anti-CD3/CD28 beads (lower panels) (one representative experiment out of five is shown). Cells were cultured in 96-well plates, 20×10<sup>3</sup> cells/well. **(b)** Cytokines released to the supernatant by CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> cells cultured and analyzed as described above by flow cytometry, either in the presence (red bars) or absence (black bars) of gliadin from CD patients and non-CD control individuals either stimulated with gliadin (gray bars) or anti-CD3/CD28-coated beads (blue bars). **(c)** Cytokines released by CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> cells treated as described in panel **b**. Results are expressed as mean±s.d. of 10 samples. \**P*<0.01. CD, celiac disease; CCR6, C-C chemokine receptor type 6; IL, interleukin; TGFβ, transforming growth factor-β.

#### Functional analysis of gliadin-specific Th17 cells from CD patients

The expression of IL-17A, TGFβ, IFNγ, IL-21, and IL-22 in response to gliadin by the indicated populations from three patients and three control individuals was measured by quantitative PCR in parallel experiments. As IL-17A<sup>+</sup> cells from non-CD individuals did not respond to gliadin, anti-CD3/CD28-stimulated Th17<sup>+</sup> cells from non-CD individuals were also included in the experiments as controls. We found that all mentioned cytokines were highly produced by the gliadin-specific Th17 CD population. Remarkably, a vigorous TGFβ expression was detected in gliadin-stimulated cells from CD patients but not in the IL-17A<sup>+</sup> counterpart population from non-CD individuals (data not shown).

These molecular observations were further studied by assessing intracellular cytokines produced by Th17 cells, at the protein level. We observed that gliadin-stimulated CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> cells from CD

patients, but not anti-CD3/CD28-stimulated CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> cells from control subjects, simultaneously produce IFNγ, IL-21, IL-22, and, strikingly, TGFβ, whereas neither IL-4 nor IL-10 production was found within Th17 CD cells (Figure 3a). These results were confirmed after analyzing the presence of secreted cytokines in the culture supernatant. Thus, we found that gliadin-specific Th17 CD cells produce significantly higher amounts of IL-21 and IL-22 (*P*<0,05) than do the same cells in the absence of gliadin and also than do their counterparts obtained from control individuals and stimulated with anti-CD3/CD28-coated beads. Remarkably, the vigorous production of TGFβ is confined to Th17 CD cells (Figure 3b). The cytokine production pattern of CD Th17<sup>-</sup> cells and control individuals showed no differences, as IFNγ was the main cytokine produced by both CD and non-CD Th17<sup>-</sup> cells in response to stimulation, whereas IL-21 and IL-22 were produced in lower amounts (Figure 3c).



**Figure 4.** Analysis of transcription factors of stimulated T cells from the duodenal lamina propria. **(a)** Expression of RORC, Tbet, and IRF4 transcription factors in sorted CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> populations, in the presence (red bars) or absence (black bars) of gliadin, from CD patients and non-CD control individuals stimulated with anti-CD3/CD28-coupled beads (blue bars). Results were normalized against *HPRT1* gene values and represented as time-fold induction. **(b)** Analysis of CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> cells from CD patients and control individuals treated as indicated in panel **a**; values represent mean±s.d. obtained in seven independent experiments. \**P*<0.05. **(c)** Representative flow-cytometric analysis of RORC and IRF4 intracellular protein expression in IL-17A<sup>+</sup> (left panels) and IL-17A<sup>-</sup> cells from CD patients challenged with gliadin (50 μg/ml). CD, celiac disease; CCR6, C-C chemokine receptor type 6; IL, interleukin; IRF4, interferon regulatory factor-4.

#### Transcription factors analysis

The characterization of gliadin-expanded IL-17A<sup>+</sup> cells from CD patients was extended to the analysis of the pattern of their transcriptional factors. Quantitation of mRNA from gliadin-stimulated cells showed a robust upregulation of the *RORC* gene in Th17 cells of CD patients and stimulated control cells compared with the steady-state mRNA of the *HPRT* gene. CD Th17 cells in the absence of gliadin also expressed RORC mRNA, but to a significantly lower extent. Interestingly, we also found a strong expression of the IRF4 transcription factor in the gliadin-stimulated Th17 CD population (Figure 5a). This factor was upregulated neither in IL-17A<sup>+</sup> cells from non-CD control individuals stimulated with anti-CD3/CD28-coated beads (Figure 4a) nor in the IL-17A<sup>-</sup> fraction of duodenal cells from CD patients (Figure 4b). Equivalent low levels of Tbet mRNA were found in IL-17A<sup>+</sup> cells from CD patients and controls (Figure 4a). However, the Tbet factor was highly expressed within the IL-17A<sup>-</sup>-stimulated population of CD patients and non-CD individuals (Figure 4b). We confirmed by intracellular staining, followed by flow cytometry, the expression of RORC and IRF4 transcription factors in IL-17A<sup>+</sup> cells from CD patients and their absence in the IL-17A<sup>-</sup> cell fraction (Figure 4c).

#### TGFβ produced by CD IL-17A<sup>+</sup> T cells is biologically active and regulates IL-17A production

As we found that Th17<sup>+</sup> cells isolated from CD patients also produce TGFβ, we addressed the functional role of this pleiotropic factor on this cell population. Therefore, Th17<sup>+</sup> cells were cultured for 16 h in the absence or presence of minute amounts of TGFβ (5 ng/ml). We

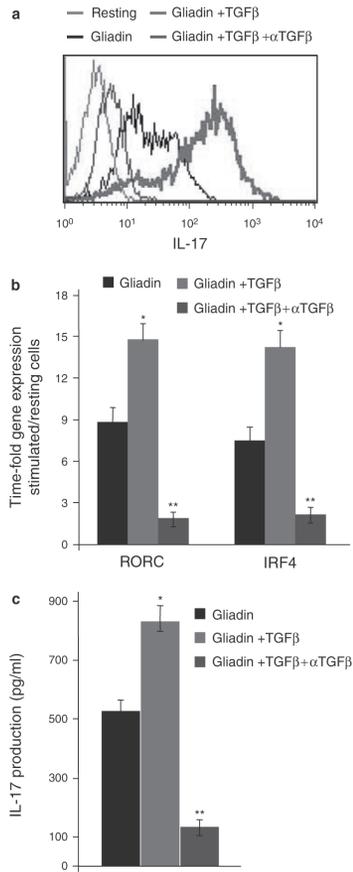
found that addition of TGFβ to the Th17<sup>+</sup> cell culture resulted in a vigorous stimulation of the production of IL-17A, as determined by a shift in the mean fluorescence intensity channel of the stained cells at the end of the culture, from a mean fluorescence channel of 23 in untreated cells to 246 mean fluorescence channel in TGFβ-treated cells (Figure 5a). Finally, we studied the impact of TGFβ on the RORC and IRF4 expression of stimulated Th17<sup>+</sup> cells. We found that addition of 5 ng/ml TGFβ to Th17<sup>+</sup> cells significantly increased the expression of RORC and IRF4 transcription factors (Figure 5b, solid bars). The specificity of the effect was demonstrated by blocking experiments adding 10 μg/ml anti-TGFβ mAb to the cultures. We found that blockade of TGFβ results in a significant reduction in the mean fluorescence channel (down to mean fluorescence channel 5), number of IL-17A-stained cells (Figure 5a), as well as in the expression of RORC and IRF4, which in both cases fell below the levels of stimulated cells alone (Figure 5b, empty columns). Finally, IL-17A secreted to culture supernatants was also inhibited in the presence of anti-TGFβ mAb, demonstrating that TGFβ produced by CD IL-17A<sup>+</sup> T cells is biologically active, thereby supporting the observation that autocrine secretion of TGFβ has a positive regulatory role in the production of IL-17A by Th17 cells derived from the intestinal mucosa of CD patients.

#### DISCUSSION

Mounting evidence suggests the participation of Th17 cells in the pathogenesis of autoimmune diseases. However, the role of these cells in CD has not been so far extensively studied. Owing to this lack of information, in this study, we have addressed the characterization of

8 Fernández *et al.*

COLON/SMALL BOWEL



**Figure 5.** Autocrine TGF $\beta$  regulates IL-17A production. **(a)** Flow cytometry overlay of IL-17A<sup>+</sup> cells from CD patients resting (green line) stimulated with gliadin (black line); gliadin plus 5 ng/ml of TGF $\beta$  (red line); or gliadin plus 5 ng/ml of TGF $\beta$  in the presence of neutralizing amounts (10  $\mu$ g/ml) of anti-TGF $\beta$  mAb (blue line). **(b)** Expression of RORC and IRF4 transcription factors determined by qPCR in CCR6<sup>+</sup> cells stimulated as described in panel **a**. Results are expressed as normalized mean  $\pm$  s.d. of time-fold expression over values of non-stimulated cells ( $n=5$ ) (gliadin + TGF $\beta$  \* $P<0.05$ ; gliadin + TGF $\beta$  + anti-TGF $\beta$  \*\* $P<0.01$ ).  $P$ -values are for both RORC and IRF4. **(c)** IL-17A detected in supernatants of cultures treated as described in panels **a** and **b**. Results represent mean  $\pm$  s.d. ( $n=5$ ) (gliadin + TGF $\beta$   $P<0.05$ ; gliadin + TGF $\beta$  + anti-TGF $\beta$   $P<0.01$ ). CD, celiac disease; CCR6, C-C chemokine receptor type 6; IL, interleukin; IRF4, interferon regulatory factor-4; mAb, Monoclonal antibody; TGF $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; qPCR, quantitative PCR.

CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> T lymphocytes present in the duodenal mucosa of CD patients, a tissue where both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells producing IL-17A have recently been found (24).

Our results indicate that the duodenal mucosa of active CD patients contains CD4<sup>+</sup> T cells that produce IL-17A in significantly higher amounts than those found in the mucosa of non-CD control individuals. Th17 CD cells share with the “classical” Th17 population phenotypical features such as the expression of CCR6, CD161, and IL-23 receptor, although some studies were unable to find expression of the latter in the active CD mucosa (26). The fact that multiple splice forms of the human interleukin-23 receptor  $\alpha$ -chain are found in activated leukocytes (27) and the “*ex vivo*” cell-expansion conditions used may account for the differences observed. CD161, on the other hand, has been proposed as a marker for IL-17A-producing cells (28). However, we found that CD161-positive cells do not include all IL-17A-producing CD cells, or otherwise that not all IL-17A-producing cells are derived from the same cell precursors (29).

We have shown that IL-17A-producing cells from the celiac mucosa, but not those obtained from controls, are gliadin specific. This finding is nevertheless in contradiction with a recent study showing that gluten-reactive T-cell lines from treated patients produce IL-21 but not IL-17 or IL-22 (30). However, there are some important differences in the experimental approaches undertaken by the two studies. First, all participating patients in our study had never received any treatment, whereas Bodd *et al.* used long-term cell lines from treated patients. Second, the cells used in our study were sorted based on their CCR6 surface expression and subsequently expanded by gliadin challenge in culture. Third, our cells were cultured in the presence of exogenous IL-23, a cytokine that is required to sustain the IL-17 phenotype. The combination of these factors apparently results in expanded populations that have different characteristics. Indeed, only a small percentage of cells contained in the cell lines derived from the CD mucosa by Bodd *et al.* showed HLA DQ2-restricted gluten reactivity. Despite these authors’ failure to detect gluten-reactive Th17 cells within the cell lines derived from the CD intestinal mucosa, they report, interestingly, a small percentage of CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup> cells in fresh blood peripheral cells of CD patients after an oral gluten challenge.

The reactivity of cells is restricted to gliadin, as we failed to observe any proliferation in response to transglutaminase. This finding is fully consistent with previous data showing no detection of transglutaminase-reactive cells within the CD mucosa (31), although a recent study has found that transglutaminase-specific Th1 cell clones derived from peripheral blood of some, but not all, active CD patients induce *ex vivo* typical lesion changes in the CD intestinal mucosa. The detection of these reactive cells was influenced by the clinical situation of patients and also required 8–10 weeks of repeated stimulation, thus indicating that even a small percentage of transglutaminase-reactive cells that were undetectable in our short-term cultures are nevertheless enough to contribute to intestinal damage (32).

The presence of IL-17<sup>+</sup> gliadin-specific cells in the CD intestinal mucosa constitutes strong evidence for an active involvement of Th17 cells in the pathogenesis of CD. We found that activation of Th17 cells of CD patients is controlled by the same transcription factors than their counterparts from non-CD control individuals. However, the expression pattern of these factors is not the same. There is a very high expression of IRF4 in CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> cells

from CD patients compared with their non-CD counterparts. This fact suggests that a strong upregulation of IRF4 is relevant for the Th17-specific response to gliadin-derived peptides. IRF4 facilitates RORC expression, a factor that is required for differentiation of Th17 cells, as it was first described in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis (33). The detection of the IRF4 protein inside IL-17A<sup>+</sup> cells reinforces the idea that IRF4 influences RORC expression in gliadin-specific IL-17A duodenal T cells. It is also noteworthy that, in the aforementioned model of experimental autoimmune encephalomyelitis, a significant IL-17A production was achieved in mice bearing a single copy of the *IRF4* gene that also rescued the IL-22 production ability (34). Thus, it is conceivable that the high amount of IL-22 detected in our Th17 cells from CD patients compared with IL-17A-producing cells from control individuals might be related to the upregulation of IRF4. As expected, equally high levels of RORC are found in Th17 cells from CD and non-CD control individuals. T-bet, the master regulator of Th1 cell differentiation was expressed by Th17 CD cells, although at levels lower than those of RORC and IRF4. This finding leaves open the possibility that CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> cells in the CD mucosa are not, *sensu stricto*, classical Th17 cells, or otherwise that classical Th1 and Th17 subtypes are not closed compartments, as a number of groups have recently shown to occur with Th17 cells and Treg cells (35,36). In this regard, the concomitant production of IFN $\gamma$ , a "Th1 type" cytokine, should be observed. The production of IFN $\gamma$  by cells committed to the production of IL-17A clearly supports a prominent role of Th17 cells in CD pathogenesis. However, whether both cytokines influence each other's function and/or production requires further investigation.

Our data show that whereas IL17<sup>-</sup> cells produce IL-21, the amount of this cytokine produced by Th17 CD cells is significantly higher. The precise role of IL-21 in the pathogenesis of CD remains unresolved. In this regard, the enhanced expression of IL-21 in the mucosa of untreated CD patients related to gluten challenge has been reported (37). These and our data suggest that IL-21 has a role in sustaining T-bet expression and IFN $\gamma$  production, thereby contributing to the dominant Th1 response observed in the mucosa of CD patients.

We found that Th17 mucosal cells from CD patients express two cytokines with well-known dual opposing effects: IL-22 and TGF $\beta$ . Both cytokines have anti-inflammatory and proinflammatory roles (38), depending on the targeted cells (14,39) and the inflamed organ (40–43). As the IL-22 receptor is highly expressed by epithelial cells of the intestine (44), the enhanced IL-22 production by CD IL-17A<sup>+</sup> cells, which also produce TGF $\beta$ , allows the idea that Th17 cells might have a dual role in CD: a proinflammatory role, by means of Th1 cytokines contributing to mucosal inflammation and disease progression, or an anti-inflammatory, protective role, exerted through TGF $\beta$  and IL-22 that would hurdle the Th1 response, as is the case recently observed in an animal model of inflammatory bowel disease (45). Consequently, it is relevant to elucidate more precisely the role of IL-22 in the pathogenesis of CD, as IL-22 might well be considered for future biological therapy because of its selective modulation of tissue response while showing no direct effects on the immune response.

One of the most striking findings of our study is that IL-17A cells from active CD patients also produce TGF $\beta$ . This result adds a new

feature to the known homeostatic role of TGF $\beta$  in the intestine by modulating the participation of Th17 cells in the gliadin-specific response in an autocrine/paracrine manner. Such a paradoxical effect may be related to the observation that tumors secreting large quantities of TGF $\beta$  induce the development of IL-17A<sup>+</sup> cells, which in turn promote tumor survival in an IL-17A-dependent manner (46). It has been described in a model in which TGF $\beta$  activity is deficient in the CD mucosa because of the action of IL-15, the signals of which activate Jun N-terminal kinase leading to TGF $\beta$  inhibition (47). However, the neat dual effects of TGF $\beta$  on IL-17A production observed in our study indicate that TGF $\beta$  is operative within the context of the CD mucosa and reinforces the significance of TGF $\beta$  produced by IL-17A CD cells as biologically active, as it the case of CD8<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> intraepithelial lymphocytes from CD patients with regulatory activity mediated by their secreted TGF $\beta$  (18). In this regard, our preliminary data point out that Th17 cells that also produce TGF $\beta$  do not have the capacity to behave as regulators of effector T cells stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs (Ortega *et al.*, unpublished observations). We have not found CD4<sup>+</sup> cells from CD patients exclusively committed to the production of IL-17A, as most CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> cells also produce IFN $\gamma$  and/or TGF $\beta$ . This is a significant difference with canonical Th17 cells, which produce neither IFN $\gamma$  nor TGF $\beta$  and represent another relevant finding of our study. This is apparently in contrast with the results reported in a previous study, which showed the existence of gliadin-specific Treg cells (presumably IL-17A<sup>-</sup>) in the celiac mucosa (6). In that study, the biological activity of TGF $\beta$  was elegantly demonstrated as its *in vitro* neutralization (using an anti-TGF $\beta$  mAb) rescued IFN $\gamma$  production by T cells in response to gliadin when co-cultured in the presence of Treg cells, thereby supporting gliadin-specific Treg cells as the main source for TGF $\beta$  in that experimental setting. However, the model by Gianfrani *et al.* differs from that of ours in two relevant aspects: first, Treg cells were obtained from cultures in the presence of high amounts of exogenous IL-10, a cytokine that was neither used by us nor secreted by our IL-17A-producing cells, and second, cells studied by these authors (Treg cells) were grown in culture for a much longer period of time and their ability to produce TGF $\beta$  or IL-17A was not formally addressed. However, we cannot exclude the possibility that mucosal CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> cells from untreated celiac patients and CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup> or CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells from non-CD patients may acquire the ability to secrete TGF $\beta$  if cultured for an extended period of time and/or in the presence of other cytokine(s) that could be present at the inflammation site in the small intestine.

Taken together, these differences raise interesting issues, still unraveled, such as: where are IL-17A-producing cells present in the CD mucosa site generated or polarized. In this regard, we have previously shown that IL-17A production by cells from psoriatic skin could be modulated *in vitro* in response to different polarizing conditions (22). It is being accepted that Th17 cells could originate from Treg cells by a conversion mechanism (48). Our observation that Th17 cells concomitantly produce TGF $\beta$  may be interpreted in favor of a common origin of Th17 and Treg cells. However, we found that Th17 cells express neither FoxP3 nor IL-10, observations that do not argue against this common origin but rather against the possibility that the Th17 cells shown herein could represent a transitional state

from Treg cells becoming Th17 cells, as this population does not retain any of the characteristics of Treg cells, with the exception of its ability to produce TGF $\beta$  (48,49). However, our data do not formally exclude this possibility, which needs to be further explored in detail in CD. Indeed, increasing evidence clearly points to the diversity and functional duality of Th17 cells (50). As an example, Cosmi *et al.* (51), have recently shown the existence of Th17 cells also able to produce IL-4 under appropriate polarizing conditions, thereby adding new data supporting the plasticity of Th17 cells.

In conclusion, our data demonstrate the presence of gluten-specific IL-17A-producing cells in the duodenum of CD patients, which have the ability to secrete some cytokines with known dual opposing effects on the inflammatory process. These findings strongly support the involvement of Th17 cells in the pathogenesis of CD, and suggest that IL-17A-producing cells might not be univocally linked to the promotion of self-tissue damage during autoimmune responses. Thus, the understanding of the activity of Th17 cells in CD is of clinical and therapeutical relevance, as they may open new approaches to the biological treatment of the disease.

#### CONFLICT OF INTEREST

**Guarantor of the article:** Manuel Santamaría, MD, PhD.

**Specific author contributions:** Study design, supervision, and data analysis: Manuel Santamaría and Consuelo Ortega; writing of the manuscript: Manuel Santamaría, Consuelo Ortega, and Ignacio J. Molina; cellular works, cytometry, functional studies, and statistical data: Silvia Fernández, Ignacio J. Molina, Pilar Romero, and Orlando Estevez; HLA typing: Rafael González and José Peña; patient and control subjects' recruitment and biopsy procedures: Francisco Sánchez and Fernanda R. Reynoso.

**Financial support:** This work was supported by Grant nos SAF2003-09807-CO2-01 and SAF2006-09991 from the Spanish Ministry of Education. Consuelo Ortega is funded by the Grant no. 12-2005-080 from UCO-Phadia Spain.

**Potential competing interests:** None

#### Study Highlights

##### WHAT IS CURRENT KNOWLEDGE

- ✓ Th17 cells are a distinct T-lymphocyte sub-population.
- ✓ Th17 cells participate in the pathogenesis of autoimmune diseases.
- ✓ Th17 cells secrete interleukin (IL)-17 and IL-21.
- ✓ Th17 cytokine signature has been described in the celiac mucosa.

##### WHAT IS NEW HERE

- ✓ Gliadin-specific Th17 cells are increased in the celiac disease (CD) mucosa.
- ✓ Th17 cells from CD patients secrete IL-17, interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL-21, IL-22, and transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) in response to gluten challenge.
- ✓ In CD patients, but not in control individuals, mucosa-derived Th17 cells require RORC and interferon regulatory factor-4 (IRF4) transcription factor expression.
- ✓ In CD patients, IL-17 production by Th17 gliadin-specific cells is under TGF $\beta$  autocrine regulation.

#### REFERENCES

1. Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med* 2007;357:1731–43.
2. Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:516–25.
3. Monteleone I, Monteleone G, Del Vecchio Blanco G *et al.* Regulation of the T helper cell type 1 transcription factor T-bet in celiac disease mucosa. *Gut* 2004;53:1090–5.
4. Frisullo G, Nociti V, Iorio R *et al.* T-bet and pSTAT-1 expression in PBMC from celiac disease patients: new markers of disease activity. *Clin Exp Immunol* 2009;158:106–14.
5. Jabri B, Meresse B. NKG2 receptor-mediated regulation of effector CTL functions in the human tissue microenvironment. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;298:139–56.
6. Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C *et al.* Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol* 2006;177:4178–86.
7. Forsberg G, Hernell O, Melgar S *et al.* Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterology* 2002;123:667–78.
8. Forsberg G, Hernell O, Hammarstrom S *et al.* Concomitant increase of IL-10 and pro-inflammatory cytokines in intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease. *Int Immunol* 2007;19:993–1001.
9. Korn T, Mitsdoerffer M, Kuchroo VK. Immunological basis for the development of tissue inflammation and organ-specific autoimmunity in animal models of multiple sclerosis. *Results Probl Cell Differ* 2010;51:43–74.
10. Korn T, Oukka M, Kuchroo V *et al.* Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007;19:362–71.
11. Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM *et al.* CCR6 recruits regulatory T cells and Th17 cells to the kidney in glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:974–85.
12. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L *et al.* The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121–33.
13. Wurster AL, Rodgers VL, Satoskar AR *et al.* Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *J Exp Med* 2002;196:969–77.
14. Wolk K, Kunz S, Witte E *et al.* IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004;21:241–54.
15. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008;14:282–9.
16. Volpe E, Servant N, Zollinger R *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008;9:650–7.
17. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol* 2009;27:313–38.
18. Bhagat G, Nayer AJ, Shah JG *et al.* Small intestinal CD8<sup>+</sup>TCR $\gamma$ delta<sup>+</sup> intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest* 2008;118:281–93.
19. Shull MM, Ormsby I, Kier AB *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693–9.
20. Powrie F, Carlino J, Leach MW *et al.* A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;183:2669–74.
21. Korn T, Bettelli E, Oukka M *et al.* IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–517.
22. Ortega C, Fernandez AS, Carrillo JM *et al.* IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J Leukoc Biol* 2009;86:435–43.
23. Castellanos-Rubio A, Santin I, Irastorza I *et al.* TH17 (and TH1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin. *Autoimmunity* 2009;42:69–73.
24. Monteleone I, Sarra M, Del Vecchio Blanco G *et al.* Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa. *J Immunol* 2010;184:2211–8.
25. Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in celiac disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:858–70.
26. Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE *et al.* Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115:551–63.
27. Kan SH, Mancini G, Gallagher G. Identification and characterization of multiple splice forms of the human interleukin-23 receptor alpha chain in mitogen-activated leukocytes. *Genes Immun* 2008;9:631–9.

28. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V *et al*. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 2008;205:1903–16.
29. Awasthi A, Riol-Bianco L, Jager A *et al*. Cutting edge: IL-23 receptor gfp reporter mice reveal distinct populations of IL-17-producing cells. *J Immunol* 2009;182:5904–8.
30. Bodd M, Raki M, Tollefsen S *et al*. HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. *Mucosal Immunol* 2010;3:594–601.
31. Molberg O, McAdam S, Lundin KE *et al*. T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated *in situ* by endogenous tissue transglutaminase. *Eur J Immunol* 2001;31:1317–23.
32. Ciccioppo R, Finamore A, Mengheri E *et al*. Isolation and characterization of circulating tissue transglutaminase-specific T cells in coeliac disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010;23:179–91.
33. Brustle A, Heink S, Huber M *et al*. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 2007;8:958–66.
34. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP *et al*. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203:2271–9.
35. Afzali B, Mitchell P, Lechler RI *et al*. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2009;119:120–30.
36. Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol* 2009;9:883–9.
37. Fina D, Sarra M, Caruso R *et al*. Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. *Gut* 2008;57:887–92.
38. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M *et al*. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:447–53.
39. Weiss B, Wolk K, Grunberg BH *et al*. Cloning of murine IL-22 receptor alpha 2 and comparison with its human counterpart. *Genes Immun* 2004;5:330–6.
40. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM *et al*. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007;27:647–59.
41. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E *et al*. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008;118:534–44.
42. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM *et al*. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 2008;29:947–57.
43. Chang H, Hanawa H, Liu H *et al*. Hydrodynamic-based delivery of an interleukin-22-Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Immunol* 2006;177:3635–43.
44. Wolk K, Witte E, Hoffmann U *et al*. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol* 2007;178:5973–81.
45. O'Connor W Jr, Kamanaka M, Booth CJ *et al*. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009;10:603–9.
46. Nam JS, Terabe M, Kang MJ *et al*. Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Res* 2008;68:3915–23.
47. Benahmed M, Meresse B, Arnulf B *et al*. Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology* 2007;132:994–1008.
48. Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I *et al*. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 *ex vivo* and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:8635–40.
49. Leveque L, Deknuydt F, Bioley G *et al*. Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4+ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells. *J Immunother* 2009;32:101–8.
50. O'Connor W Jr, Zenewicz LA, Flavell RA. The dual nature of T(H) 17 cells shifting the focus to function. *Nat Immunol* 2010;11:471–6.
51. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V *et al*. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:222–30.

