La sinergia entre la IL-15 y IL-23 desencadena una respuesta IL-17 en los linfocitos T CLA+ ante células epidérmicas autólogas en psoriasis

Luis F Santamaria-Babí[1,3], Marta Ferran[2,3], Ester Ruiz-Romeu[1], Marc Sagristà[4], Pablo García[2,3], Antonio Celada[5], Ramon M. Pujol[2,3]

[1]Inmunología Translacional, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Biología, Universitat de Barcelona.
[2]Departamento de Dermatología, Hospital del Mar, Universitat Autónoma de Barcelona. [3]Grupo de Investigación en Enfermedades Inflamatorias y Neoplásicas Dermatológicas, IMIM, Barcelona
[4]Hospital Sant Jaume de Calella, Barcelona. [5]Biología del Macrófago, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Biología, Universitat de Barcelona

Introducción

La IL-15 es una citoquina que ha emergido como una diana potencialmente relevante en psoriasis, y parece que sería importante dentro de la respuesta IL-17, juntamente con otras citoquinas como la IL-23. Sin embargo, en humanos la IL-15 está poco caracterizada. Es conocido que en piel afecta de psoriasis tanto la IL-23 como la IL-15 son expresadas constitutivamente. Asimismo, el gen de la IL-15 forma parte de los genes de susceptibilidad asociados a la psoriasis, junto a otros genes como el IL23R o el HLA-Cw6. El objetivo de este estudio es evaluar la respuesta de nuestro modelo de cocultivo *exvivo*, formado por linfocitos T CLA$^{+/-}$ junto a células epidérmicas lesionales autólogas de pacientes con psoriasis, ante la activación con IL-15 e IL-23.

Material y métodos

Para el estudio se incluyeron 7 pacientes con psoriasis y 3 controles sanos. Tras consentimiento informado, se les realizó una extracción sanguínea y 2 biopsias tipo punch. De la sangre, se aislaron los linfocitos T memoria CLA$^+$ y CLA$^-$, mediante sucesivas separaciones inmunomagnéticas, y de las biopsias cutáneas, se obtuvieron células epidérmicas (Epi). Para la realización del cocultivo, se sembraron 1,6 x10^4 CLA$^+$/CLA$^-$ junto con 1x10^4 células epidérmicas autólogas. Tanto las subpoblaciones de linfocitos T memoria CLA$^+$ /CLA$^-$ y células epidérmicas, como el cocultivo, fueron activados con 10 ng/mL de IL-15 y/o IL-23 humanas recombinantes. Asimismo, se realizó un bloqueo de dicha activación con anticuerpos neutralizantes HLA-A/B/C (clase I) and HLA-DR (clase II) vs un control con isotipo IgG, que se añadieron al día 0, a una concentración final de 10 µg/mL. Tras 5 días de cultivo, se midieron las concentraciones de IL-17A e IFN-γ mediante ELISA, y de IL-17F por inmunoensayo multiparamétrico por citometría de flujo (CBA) en las diferentes combinaciones de cultivo.
Para el estudio estadístico se utilizó el análisis de varianza unidireccional con el método Dunnet para evaluar las diferencias respecto a las condiciones basales. (#: p<0.05; ##: p<0.01) y la prueba de T-student para comparar entre grupos (*:p<0.05; **: p<0.01; ***:p<0.001)

Resultados

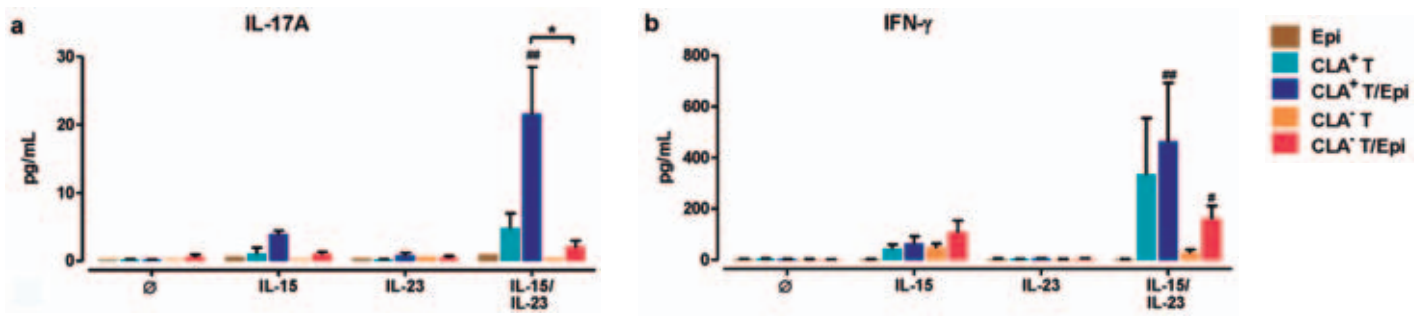

FIGURA 1. La IL-23 actúa sinérgicamente con la IL-15 para inducir la producción de IL-17A y IFN-γ. Únicamente la producción de IL-17A se vio aumentada ante la presencia de células epidérmicas.
Se muestran los resultados del ELISA de IL-17A (n=3) (a) y IFN-γ (n=4) (b) a partir de los sobrenadantes recogidos el día 5, en las diferentes combinaciones de cultivos activados. A pesar que los niveles de IFN-γ fueron más elevados que los de IL-17A, en la condición de linfocitos T CLA$^+$, se observó una producción más selectiva de IL-17 en el cocultivo de CLA$^+$ T/Epi, hecho que indica el papel relevante de las células epidérmicas en el efecto sinérgico de IL-15/IL-23 en la producción de IL-17A.
(#: p<0.05; ##: p<0.01, *:p<0.05)

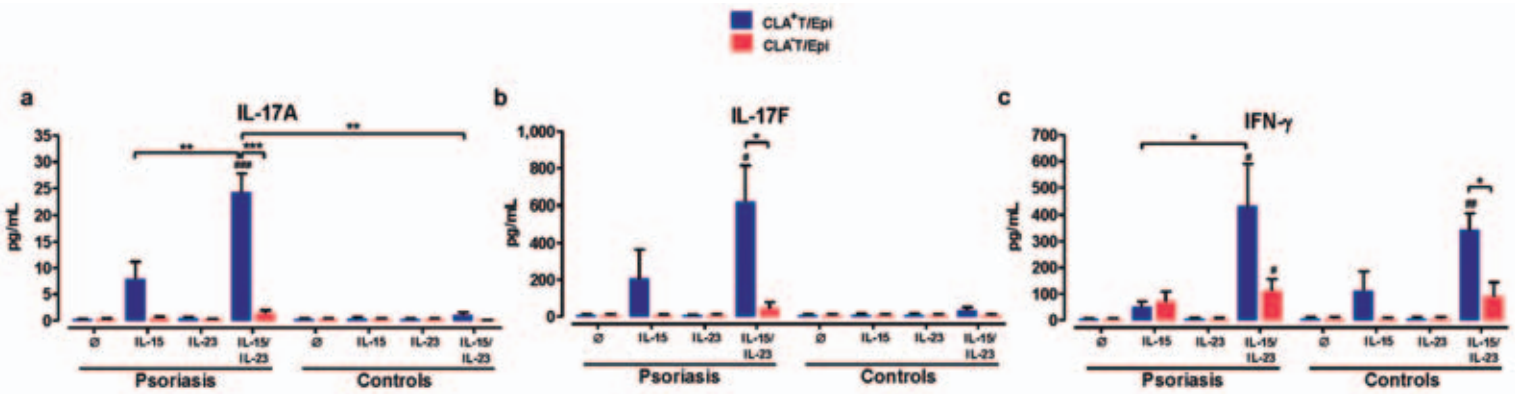

FIGURA 2. La activación combinada con IL-15 e IL-23 estimula la producción de IL-17A y la IL-17F en la condición de cocultivo de linfocitos T CLA$^+$ y células epidérmicas.
Teniendo en cuenta que la presencia de células epidérmicas parecía ser importante para una mayor producción de citoquinas, se evaluó la respuesta inflamatoria en cocultivos realizados a partir de pacientes con psoriasis y controles sanos. Se midió la IL-17A (n=6) (a), IL-17F (n=4) (b) and IFN-γ (n=6) (c) en los sobrenadantes a los 5 días. La IL-17F se incluyó en el estudio para aumentar sensibilidad en la respuesta T-17. En cocultivos de controles sanos activados por IL-15 e IL-23, apenas se observó producción de IL17A o IL17F. En cambio, los niveles de IFN-γ fueron similares en psoriasis y controles sanos.
(#: p<0.05; ##: p<0.01; ###: p<0.001). Simple T-test was used to compare two different groups (*:p<0.05; **: p<0.01; ***:p<0.001).

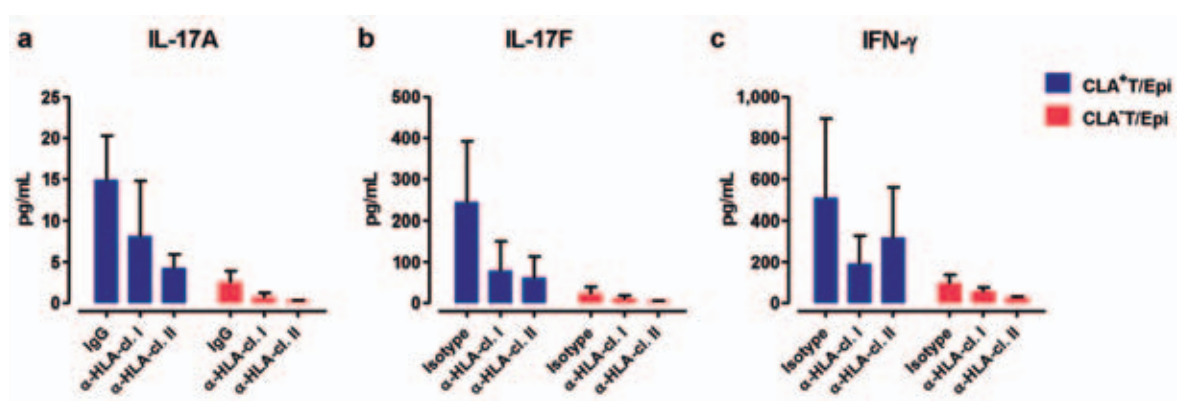

FIGURA 3. LA producción de IL-17A, IL-17F y IFN-γ inducidos por IL15 y IL-23 es dependiente de moléculas HLA de clase I y II. Se añadieron anticuerpos bloqueantes anti-HLA-A/B/C (class I) o HLA-DR (class II) a los cocultivos con células de psoriasis previo a la incubación IL-15 y IL-23. Tras 5 días, se extrajeron los sobrenadantes para análisis de IL-17A (n=4) (a), IL-17F (n=3) (b), y IFN-γ (n=4) (c). Ambos anticuerpos redujeron la producción de citoquinas (40-80%), aunque el bloqueo de HLA-clase II mostró una mayor disminución de los productos T-17 (IL-17A y IL-17F). Estos resultados sugieren que tanto los linfocitos T CD4$^+$ y CD8$^+$ estarían implicados.

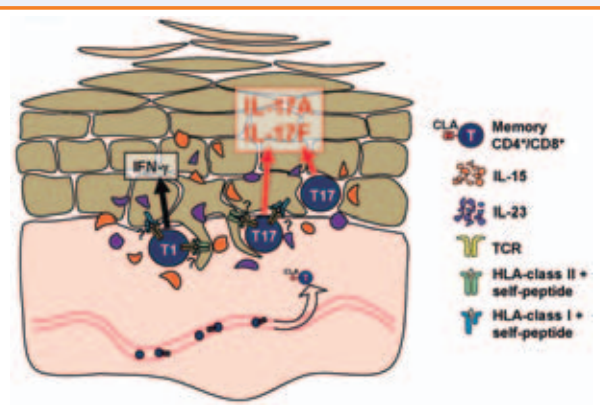

FIGURA 4. Esquema. Las fuentes de IL-15 y IL-23 en la piel incluyen los queratinocitos y las células de Langerhans. Ambas citoquinas están presentes en las lesions inflamadas de psoriasis. Durante el brote de psoriasis, los linfocitos T CLA$^+$ migran a la piel e interaccionan con células epidérmicas. Nuestro modelo experimental, reproduciría este escenario de interacción de los linfocitos T CLA$^+$, con tropismo cutáneo, con las células epidérmicas ante la presencia de IL-15 y IL-23. En estas condiciones, los linfocitos T CLA$^+$ producirían IL-17A, IL-17F y IFN-γ posiblemente a través de presentación de un antígeno propio (considerando que IL-15 está asociada a autoreactividad). Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares exactos son todavía desconocidos.

Conclusiones

El presente estudio muestra un efecto sinérgico de la IL-15 y IL-23 sobre los linfocitos T CLA$^+$ que promueve la producción de IL-17A, IL-17F and IFN-γ en psoriasis. Este efecto se ve potenciado ante la presencia de células epidérmicas lesionales autólogas, observándose un aumento preferencial de citoquinas T-17 (IL-17A y IL-17F). Dado que la producción de dichas citoquinas se ve inhibida con el bloqueo de las moléculas HLA-clase I y también II, parece que tanto los linfocitos T CD4$^+$ and CD8$^+$ estarían implicados, sugiriéndose el papel de presentación de antígenos propios. El hecho que la producción IFN-γ no estuviera aumentada por las células epidérmicas y que fuera similar entre cocultivos de psoriasis y controles sanos sugiere que las células epidérmicas lesionales podrían tener un rol diferencial.

Referencias bibliográficas

1. McInnes IB, Gracie JA. Interleukin-15: a new cytokine target for the treatment of inflammatory diseases. Curr Opin Pharmacol. 2004;4:392-7.
2. Villadsen LS, Schuurman J, Beurskens F, Dam TN, Dagnaes-Hansen F, Skov L, Rygaard J, Voorhorst-Ogink MM, Gerritsen AF, van Dijk MA, Parren PW, Baadsgaard O, van de Winkel JG. Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. J Clin Invest. 2003;112:1571-80
3. Duffin KC, Krueger GG. Genetic variations in cytokines and cytokine receptors associated with psoriasis found by genome-wide association. J Invest Dermatol. 2009;129:827-33.
4. Zhang XJ, Yan KL, Wang ZM, Yang S, Zhang GL, Fan X, Xiao FL, Gao M, Cui Y, Wang PG, Sun LD, Zhang KY, Wang B, Wang DZ, Xu SJ, Huang W, Liu JJ. Polymorphisms in interleukin-15 gene on chromosome 4q31.2 are associated with psoriasis vulgaris in Chinese population. J Invest Dermatol. 2007;127:2544-51.
5. Elder JT. IL-15 and psoriasis: another genetic link to Th17? J Invest Dermatol. 2007 Nov;127(11):2495-7.
6. Ortega C, Fernández-A S, Carrillo JM, Romero P, Molina IJ, Moreno JC, Santamaría M. 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.

AGRADECIMIENTOS
Este estudio se ha realizado gracias a las becas FIS/ISCIII 2013 (PI09/2222, PI13/01845, PI13/01716) y FPU13/02308.

Hospital del Mar
Parc de Salut MAR Barcelona