



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES HIF-1ALFA, FOXP3 Y
ROR GAMA T EN LUPUS ERITEMATOSO DISCOIDE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

CARMEN ARACELI TORRES ZÁRATE



MÉXICO, D. F.

AÑO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
VOCAL: Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ
SECRETARIO: Profesor: LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
1er. SUPLENTE: Profesor: MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO
2° SUPLENTE: Profesor: GIBRAN PÉREZ MONTESINOS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ) DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES BERNARDO SEPÚLVEDA EN CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.

EN COLABORACIÓN CON UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO, FEDERICO GÓMEZ.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. MARCELA ALCÁNTARA HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE:

CARMEN ARACELI TORRES ZÁRATE



ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de Figuras y Tablas	
Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	
- Estructura y Organización de la Piel	3
- La piel forma parte del Sistema Inmune	6
- Lupus Eritematoso Discoide	7
- Células T _{reg} y T efectoras Th17	11
Antecedentes	
- Células T _{reg} en Lupus Eritematoso Sistémico (LES)	14
- Células Th17 en LES	14
- Balance Th17/T _{reg}	15
- Inmunidad en Lupus Cutáneo	18
Antecedentes Directos al Trabajo	20
Justificación	21
Hipótesis y Objetivos	22



Metodología

-	Universo de Trabajo	23
-	Criterios de Inclusión y Exclusión	23
-	Procedimientos	
o	Anticuerpos y Reactivos	24
o	Construcción del Microarreglo de Tejido	24
o	Tinciones de Inmunohistoquímica	26
o	Análisis de la Expresión de Marcadores en el Microarreglo de Tejido	27
o	Análisis Estadístico	27

Resultados

I	Reclutamiento de Pacientes	28
II	Evaluación y Análisis de la Expresión de ROR γ t <i>in situ</i>	29
III	Análisis de la Expresión de FOXP3 en el microarreglo de muestras de tejidos.	32
IV	Evaluación y Análisis de la Expresión de HIF-1 α <i>in situ</i> en biopsias de lesiones.	35
V	Correlaciones obtenidas entre HIF-1 α , FOXP3 y ROR γ t.	38

Discusión	39
-----------	----

Conclusiones	43
--------------	----

Bibliografía	44
--------------	----



ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS

	<u>Título</u>	<u>Página</u>
<i>Figura 1</i>	Anatomía de la piel y células efectoras.	4
<i>Figura 2</i>	Lesiones características de LED.	10
<i>Figura 3</i>	Mapa del Microarreglo en el que se muestra la disposición que ocupa cada uno de los pacientes y controles obtenidos.	27
<i>Figura 4</i>	Diferencias en la expresión de RORγt en el microarreglo de tejido de biopsias de pacientes con LED e individuos normales.	32
<i>Figura 5</i>	Células FOXP3⁺ se encuentran tanto en el infiltrado de las lesiones de LED como en controles individuales.	34
<i>Figura 6</i>	Células HIF-1a⁺ se encuentran infiltrando las lesiones en pacientes con LED.	37



<i>Gráfica 1</i>	La expresión de RORγt mostrada por la cantidad de píxeles positivos es mayor en pacientes con LED que en los controles normales.	33
<i>Gráfica 2</i>	El porcentaje de núcleos positivos para RORγt es mayor en pacientes con LED que en los controles de individuos sanos.	33
<i>Gráfica 3</i>	No existe diferencia en la expresión de FOXP3 medida por píxeles positivos en pacientes con LED e individuos control.	35
<i>Gráfica 4</i>	La expresión nuclear de FOXP3 es mayor en los individuos control que en los pacientes con LED.	36
<i>Gráfica 5</i>	La expresión de HIF-1α en pacientes con LED y controles normales no es diferente.	38
<i>Gráfica 6</i>	El porcentaje de núcleos positivos para HIF-1α en pacientes con LED es mayor en comparación con los controles.	38
<i>Gráfica 7</i>	Correlación entre la expresión de HIF-1α y FOXP3.	39
<i>Gráfica 8</i>	Correlación entre la expresión de HIF-1α y RORγt.	40
<i>Tabla 1</i>	Diferencias clínicas e inmunológicas entre los distintos tipos de lupus cutáneo.	9
<i>Tabla 2</i>	Características de los pacientes reclutados.	31



ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	LE	Lupus Eritematoso
ANA	Anticuerpo antinuclear	LEC	Lupus Eritematoso Cutáneo
CD	Célula Dendrítica	LECA	Lupus Eritematoso Cutáneo Agudo
cCD	Células Dendríticas convencionales	LECC	Lupus Eritematoso Cutáneo Crónico
CTLA-4	Antígeno 4 asociado a Linfocito T Citóxico		
CPA	Célula Presentadora de Antígeno		
CXCL 9, 10 11	Motivo de Quimiocina 9, 10, 11	LECI	Lupus Eritematoso Cutáneo Intermitente
CXCR3	Receptor de Quimiocina CXCR3	LECS	Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo
DAB	Diaminobencidina	LED	Lupus Eritematoso Discoide
dsADN	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena	LES	Lupus Eritematoso Sistémico
FOXP3	Forkhead box P3	mARN	Ácido Ribonucleico mensajero
H/E	Hematoxilina/Eosina	nTreg	Células T reguladoras naturales
HIF-1α	Factor Inducible por Hipoxia subunidad 1 alfa	pCD	Células Dendríticas plasmacitoides
HRP	Peroxidasa de Rábano	PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
ICAM 1	Molécula de Adhesión Intercelular 1	RORγt	Receptor Huérfano relacionado al Ácido Retinoico gama t
IL-1β	Interleucina 1 beta	SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
IL-6	Interleucina 6	STAT3	Transductor de señal y activador de la Transcripción 3
IL-17	Interleucina 17	TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante beta
IL-21	Interleucina 21	TI	Tolerancia Inmunológica
IL-23	Interleucina 23	TNF	Factor de Necrosis Tumoral
IL-23R	Receptor de Interleucina 23	T_{reg}	Células T reguladoras
		TSLP	Linfopoyetina Estromal Tímica
iNOS	Sintasa Óxido Nítrico inducible	UDE	Unión Dermoepidérmica
iTreg	Células T reguladoras inducidas	UIMEA	Unidad de Investigación en Enfermedades Autoinmunes
LCCT	Linfoma Cutáneo de Células T	UV	Luz Ultravioleta



RESUMEN

El lupus eritematoso (LE) es una enfermedad autoinmune caracterizada por un amplio espectro clínico que va desde lesiones exclusivamente cutáneas, hasta una enfermedad sistémica. La manifestación exclusivamente cutánea de esta enfermedad habitualmente no guarda relación con ningún otro órgano además de la piel y abarca un espectro de manifestaciones bien definidas que son englobadas bajo el término Lupus Eritematoso Cutáneo (LEC). Dentro de esta clasificación encontramos al lupus eritematoso discoide (LED).

Se sabe que en numerosas enfermedades autoinmunes las células Th17 tienen un papel patogénico, ya que perpetúan el fenómeno inflamatorio que da lugar a la enfermedad. Por otro lado, las células T_{reg} desempeñan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes contribuyendo con el control de la expansión y de la activación de las células T efectoras autorreactivas.

Recientemente se ha descrito que el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) participa en el control del balance Th17/T_{reg}. Se ha propuesto que HIF-1 α aumenta la diferenciación hacia Th17 a través de la activación transcripcional directa de ROR γ t y formando un complejo terciario con ROR γ t y p300 con el promotor de IL-17. Al mismo tiempo, HIF-1 α disminuye el desarrollo hacia T_{reg} por la unión a FOXP3 y dirigiéndolo hacia su degradación proteosomal. Sin embargo, en otros estudios se ha señalado que particularmente durante un ambiente inflamatorio hipóxico, el promotor de FOXP3 posee sitios de unión a HIF-1 α lo que promueve su transcripción y aumenta así la diferenciación hacia T_{reg}.

Con base en estos antecedentes se analizó la expresión de los factores de transcripción ROR γ t, FOXP3 y HIF-1 α en pacientes con LED por medio de la técnica de Inmunohistoquímica. Se encontró un incremento significativo en la expresión ROR γ t tanto total como nuclear en las lesiones de pacientes con LED con respecto a la piel control. Se encontró además una menor expresión de FOXP3 nuclear en lesiones de pacientes con LED con respecto a la piel control sugiriendo que en los pacientes con LED existe una pérdida en el balance Th17/T_{reg}. Por otra parte se encontró un incremento significativo en la expresión de HIF-1 α total y nuclear en lesiones de pacientes con LED con respecto a la piel control. Al realizar un análisis de correlación entre la expresión de estos marcadores se encontró una correlación directamente proporcional entre la expresión de HIF-1 α y FOXP3 y una correlación indirectamente proporcional entre HIF-1 α y ROR γ t, lo que nos sugiere que en los pacientes con LED, HIF-1 α podría estar regulando de manera positiva a FOXP3. De esta manera la expresión de HIF-1 α podría ser clave para incrementar los niveles de FOXP3 y restablecer el balance Th17/T_{reg}.



INTRODUCCIÓN

Estructura y Organización de la piel

La piel es la cubierta externa de los animales superiores, la cual separa y protege al cuerpo del medio ambiente, también facilita la percepción y comunicación con el exterior (Cojocarú, et al., 2011). La piel humana y las células inmunes que en ella se localizan proveen una protección esencial al cuerpo humano de lesiones e infecciones así como de daños físicos y químicos.

La inmunovigilancia de un órgano tan grande y expuesto presenta retos únicos para los centinelas inmunes y células efectoras. Si una respuesta es insuficiente, entonces infecciones o tumores pueden llegar a aparecer; pero si una respuesta inmune es excesiva, entonces se puede llegar a desarrollar inflamación crónica y autoinmunidad. Controlar a la respuesta inmune es a veces, el mayor reto para el mantenimiento de la integridad de la piel que es de suma importancia para la supervivencia del hospedero. Por lo tanto, ambos mecanismos activos, de defensa y tolerogénicos son usados por el hospedero para alcanzar la homeostasis inmune, asegurando que las respuestas inmunes en piel sean apropiadas para cada reto antigénico.

La piel humana tiene dos compartimientos: la dermis y la epidermis. La epidermis es el compartimento externo y a su vez se compone de cuatro estratos. El estrato basal es la capa inferior de la epidermis y es responsable de la renovación constante de células que se lleva a cabo en la epidermis. Esta capa contiene sólo una fila de células epidermales indiferenciadas, conocidas como queratinocitos basales que se dividen con frecuencia. Los queratinocitos basales se diferencian y mueven a la siguiente capa: el estrato espinoso, para iniciar el proceso de maduración, también se dividen para reponer la capa basal. Las células que se movilizan hacia el estrato espinoso cambian de una forma cilíndrica a una forma poligonal y empiezan a sintetizar queratinas las cuales son distintas a las que se encuentran en la capa basal de queratina. Los queratinocitos en el estrato granuloso están caracterizados por cuerpos oscuros de material citoplásmico y estas células producen activamente proteínas como queratina y lípidos. El estrato córneo como último producto de maduración de los queratinocitos, es el estrato superior de los cuatro estratos de la epidermis y es altamente responsable de la función de barrera de la piel. Las células que se encuentran en esta capa son llamadas corneocitos, estas células son queratinocitos muertos. Una función de los corneocitos es proveer una barrera hacia los agentes tóxicos y prevenir que la piel sufra



deshidratación. Los melanocitos son células especializadas que se encuentran en la epidermis, su principal función es producir el pigmento melanina, el cual actúa como protección contra la radiación ultravioleta. Las células de Langerhans, son otro tipo de células especializadas que se encuentran en la epidermis; aunque también pueden encontrarse en sitios extraepiteliales y son células del sistema inmune residentes en la piel. Además de ellas, las células T, principalmente células TCD8⁺ también pueden ser encontradas en los estratos basal y espinoso. La diversidad celular incluye células inmunes especializadas como son: Células Dendríticas, linfocitos CD4 T cooperadores, células T $\gamma\delta$, células T NK, macrófagos y células cebadas.

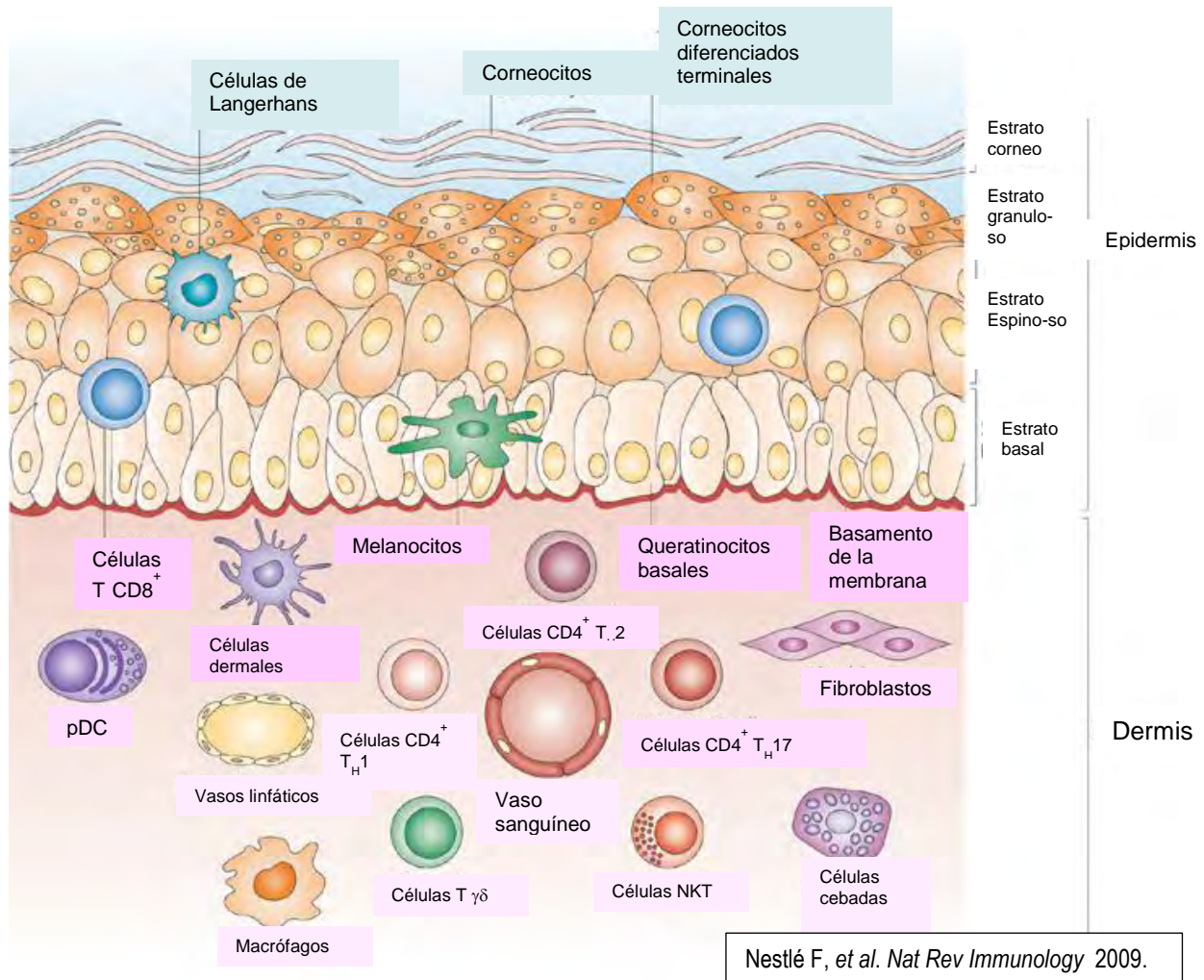


Figura 1. Anatomía de la piel y células efectoras. La estructura de la piel refleja la complejidad de sus funciones como una barrera protectora, en el mantenimiento de la temperatura corporal y recopilación de información sensorial del medio ambiente y en tener un papel activo en el sistema inmune.



La unión dermoepidérmica (UDE) es una zona de la membrana basal que forma la interfase entre la epidermis y la dermis. La principal función de la UDE es adherir la epidermis contra la dermis y viceversa, para proporcionarles resistencia contra las fuerzas externas que podrían desgarrarlas. Sirve como soporte de la epidermis, dirige la organización del citoesqueleto y cumple funciones de barrera semi-permeable (Rodríguez, Gil, 2000).

La dermis es un sistema integrado de elementos fibrosos, filamentosos, difusos y celulares del tejido conjuntivo, en el que se localizan las redes vasculares y nerviosas. Contiene muchos tipos de células residentes, entre ellos fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y mastocitos. La dermis es el constituyente mayor de la piel y le confiere flexibilidad, elasticidad y fuerza ténsil además, interactúa con la epidermis en mantener las propiedades de ambos tejidos. La dermis es drenada por conductos linfáticos y vasculares a través de los cuales las células pueden migrar (Rodríguez & Gil, 2000) (Nestle, Di Meglio, Qin & Nickoloff, 2009).



La piel forma parte del sistema inmune

La piel es un órgano complejo que realiza diversas funciones, entre las que se encuentran: el servir como barrera entre el medio interno y externo para la protección contra agresiones físicas, químicas y microbiológicas, como órgano de percepción, termorregulación, entre otras funciones. Además, es un componente del sistema inmunitario.

La respuesta inmune cutánea (tanto innata como adaptativa) involucra una coordinada acción de células dérmicas y epidérmicas mediada por una red de citocinas. En 1978, Streilein propuso que un sistema inmuno-especializado proporciona inmunidad cutánea e introdujo el concepto de “tejido linfóide asociado a la piel” (SALT). El SALT se encuentra clásicamente integrado por células residentes de la epidermis, queratinocitos, células de Langerhans, melanocitos, linfocitos T y ganglios regionales asociados a la piel. Posteriormente el concepto de SALT ha sido modificado al término “sistema inmunitario dérmico” (SID) (Castrillón et al., 2008).

Los componentes del sistema inmune innato comprenden las barreras físicas (como la piel y mucosas) y factores solubles como citocinas y quimiocinas producidas por queratinocitos, fibroblastos, células dendríticas y células polimorfonucleares (PMN). El primer mecanismo de defensa que enfrentan a los patógenos que ingresan la barrera epitelial es la vía del complemento. La vía clásica del complemento se inicia tras la unión antígeno – anticuerpo, el anticuerpo debe ser de tipo IgM o IgG.

Los péptidos antimicrobianos constituyen otro mecanismo de defensa innato del huésped, su mecanismo de acción es la inserción en la membrana de patógenos gracias a la formación de poros.

La respuesta inmune adaptativa esta mediada principalmente por linfocitos T, quimiocinas, citocinas y linfocitos B, aunque éstos no se localizan en la piel. En la piel normal reside una población de linfocitos T localizada principalmente en la dermis y por debajo de la UDE, esta población expresa al marcador CLA (Antígeno asociado a Linfocitos Cutáneos, CLA por sus siglas en inglés), dicha molécula se sintetiza cuando los linfocitos T se activan en el microambiente cutáneo. La molécula CLA es reconocida por la selectina-E que, a su vez, es una molécula de adhesión que se expresa tempranamente en la superficie de las células endoteliales durante las respuestas inflamatorias. (Robert et al., 1999). (Castrillón et al., 2008) (Modlin et al., 2003).



Lupus Eritematoso Discoide

El LE es una enfermedad crónica y autoinmune y aunque se desconoce su etiopatogenia (Jessop & Whitelaw, 2003), la interacción de factores genéticos, ambientales, factores hormonales y la ineficacia de mecanismos que protegen al individuo de la presencia de clonas autorreactivas son elementos que se consideran imprescindibles para que se desarrolle la enfermedad (Grönhagen et al., 2010a). El LE puede afectar a personas de todas las edades, grupos étnicos y ambos sexos, pero más del 90% de los pacientes que la presentan son mujeres en edad fértil (Callen, 2006; Petri & Magder, 2004). Hay evidencias que sugieren que los estrógenos estimulan el sistema inmune, lo cual puede ser la razón de una mayor incidencia en mujeres (Jessop et al., 2003).

Además de los factores antes señalados, el LE puede estar inducido por algunos medicamentos entre los que se encuentran: hidralazina, procainamida, isoniazida, metildopa, quinidina, minociclina y clorpromazina; cabe señalar que se presenta en adultos mayores con mayor frecuencia y está asociado con un periodo largo de medicación (Zandman – Goddard, et al., 2012)

Esta enfermedad se caracteriza por un amplio espectro de manifestaciones clínicas con una evolución variable derivada de la formación de autoanticuerpos y complejos autoinmunes. Las personas afectadas pueden producir autoanticuerpos contra gran variedad de antígenos tisulares, como ADN, histonas, eritrocitos, plaquetas, leucocitos y factores de coagulación. El diagnóstico de LE depende del reconocimiento de síntomas específicos y de la identificación de anticuerpos tales como los antinucleares (ANA), ADN de doble cadena (dsADN) y anticuerpos extraíbles del núcleo (ENA) que comprenden 6 tipos: anti Sm, anti RNP, anti Ro/SSA, anti La/SSB, anti Scl70 y anti Jo1. (Rodríguez, Gutiérrez & Ramos, 2006).

Las expresiones de esta enfermedad van desde la forma cutánea localizada hasta una forma sistémica que puede poner en peligro la vida del paciente (Méndez, 2009). La mortalidad está asociada con la enfermedad sistémica severa principalmente cuando se encuentran afectados órganos del sistema nervioso central y del sistema renal; sin embargo, la afectación cutánea aunque no está asociada con la mortalidad *per se*, frecuentemente produce cicatrices con una afectación considerable, tanto física como psicológica (Jessop et al., 2003) .

Algunos pacientes sólo desarrollan la enfermedad en piel, mientras que aproximadamente la mitad de los pacientes con la enfermedad sistémica desarrolla lesiones en piel (Johnson-Huang, Scott,



Krueger & Lowes, 2009). Las expresiones únicamente cutáneas de LE abarcan un espectro de subconjuntos bien definidos que son englobados bajo el término Lupus Eritematoso Cutáneo (LEC).

Hoy en día, los diversos subtipos de LEC se subdividen en cuatro categorías diferentes de acuerdo a las características histológicas de las lesiones en piel. Gilliam y Sontheimer propusieron una clasificación. Estos subtipos son: Lupus eritematoso cutáneo agudo (LECA), lupus eritematoso cutáneo subagudo (LECS), lupus eritematoso cutáneo intermitente (LECI) y lupus eritematoso cutáneo crónico (LECC) el cual incluye al lupus eritematoso discoide (LED) y al lupus profundus (Vera – Recabarren et al., 2010a, 2010b) (Samalvides & Gutiérrez, 2009).

Las características clínicas e inmunológicas de cada uno de los subtipos de Lupus Cutáneo pueden observarse en la Tabla 1.



Tabla 1. Diferencias clínicas e inmunológicas entre los distintos tipos de lupus cutáneo.

Tipo de lupus cutáneo	Descripción	Distribución	Cicatriz	Asociación con LES	Histopatología	Fotosensibilidad
LECA Localizado	Máculas y erupciones pequeñas asociadas a escama fina que puede congregarse.	Frente, área V del cuello, párpado superior, tronco.	No	72 – 90%	Lesión de queratinocitos aislados, edema, vasodilatación con extravasación de eritrocitos.	Si
Generalizado	Menos común. Erupción maculopapular. Lesiones muy rojas.	Localizada en cualquier área por arriba de la cintura.	No	5 – 10%	Atrofia epidérmica con alteración de la capa córnea.	Si
LECS¹	Lesiones anulares con bordes eritematosos elevados y aclaramiento central. Hay formas papuloescamosas.	Zonas de la piel expuestas al sol. Zona medio facial libre de lesiones. Afecta la zona V del cuello y zonas de los antebrazos.	No ²	50%	Queratinocitos dañados, atrofia epidérmica. Infiltrado linfocitario en dermis superior.	Si
LECC Discoide	Placas de eritema, escama, telangiectasias con zonas de hipopigmentación bien delimitadas y redondas.	Cara, piel cabelluda, orejas. Escasas en zonas por debajo del cuello.	Si ³	5 – 10%	Afectación en toda la zona de dermis y epidermis, lesiones en queratinocitos, melanófagos, membrana basal engrosada, tapones foliculares.	Ocasional

¹ Acompañado de manifestaciones musculoesqueléticas y presencia de anticuerpos anti-Ro/SSA (70%)

² Deja zona hipopigmentada ocasionalmente

³ Zona hipopigmentada y cicatricial; en piel cabelluda alopecia cicatricial.

Tomado de Méndez, 2009.

El LED se presenta en individuos entre los 20 y 40 años de vida. Sin embargo también puede presentarse en pacientes menores de 15 años o mayores de 80 años (aproximadamente el 5% del



total de los casos) (Crowson & Magro, 2011). La proporción de incidencia en Mujeres/Hombres es de 2:1 a 3:1 (Xie, 2011). Ocurre en todas las razas, aunque existen investigaciones que sugieren que el LED tiene una mayor prevalencia en personas de raza negra (Myrna et al., 2006). Las lesiones del LED se caracterizan por la presencia de eritema, telangiectasia, escamación que varía de fino a grueso, obstrucción folicular, atrofia y cicatrización. Las lesiones por lo general se encuentran bien delimitadas y pueden tener forma redondeada (Uva et al., 2012; Xie, 2011); éstas varían en tamaño desde unos pocos milímetros a 15 centímetros de diámetro. La presencia de cicatrices y/o atrofia es la característica que separa estas lesiones de LECS (Callen, 2006). Típicamente, las lesiones están confinadas en la cabeza, en la región del cuello, el área periorbital y los oídos, principalmente en las zonas fotoexpuestas del cuerpo (Myrna et al., 2006). Suele afectar la piel cabelluda dejando como resultado alopecia cicatrizante. Las palmas y las plantas de los pies también pueden estar involucradas, pero esto ocurre en menos del 2% de los pacientes (Uva et al., 2012).



Figura 2. Lesiones características de LED. Las lesiones son en forma de disco, placas eritematosas de diversos tamaños y contienen áreas de hiperqueratosis foliculares. (a) Alopecia cicatrizante. (b) Lesión en los oídos y área periorbital. (c) Lesiones en la mejilla. (d) Lesiones en extremidades superiores.



La aparición de las lesiones puede ser desencadenada por una variedad de factores. Pueden iniciar después de un traumatismo (11%), estrés mental (12%), quemadura solar (5%), infección (3%), exposición al frío (2%) y embarazo (1%). Aunque también se ha reportado que dos terceras partes de las lesiones inician espontáneamente. Una vez que las lesiones se desarrollaron, las exacerbaciones ocurren después de la exposición solar o traumatismo (Myrna et al., 2006).

En cuanto a la histopatología se refiere, el cambio principal se lleva a cabo en la dermis y está dado por un infiltrado celular mononuclear denso, el cual principalmente consiste en linfocitos y células plasmáticas predominantemente en el área perivascular.

En la epidermis, los cambios constan de hiperqueratosis y atrofia variable. En las lesiones activas, el infiltrado se puede encontrar en la UDE. Un infiltrado inflamatorio heterogéneo puede presentarse en la dermis superior, este infiltrado por lo general es denso y puede llegar hasta la dermis reticular profunda (Xie, 2011).

La incidencia de transformación de LED a una forma sistémica es baja, probablemente del 5 al 10% (Kind P, Lipsky P & Sontheimer R, 1986; Xie, 2011). La presencia de ANA en un título bajo no parece indicar un riesgo elevado de influir en esta transformación, incluso en pacientes expuestos a trauma, estrés o luz UV (Angotti, 2003; Crowson & Magro, 2001).

El diagnóstico de LED generalmente se realiza por examinación clínica y la realización de una historia clínica detallada atendiendo al historial familiar del paciente; la biopsia de piel es utilizada para confirmar el diagnóstico cuando la examinación clínica es dudosa. El test de autoanticuerpos (tales como el título de anticuerpos antinucleares) pueden ser positivos en LEC pero no necesariamente implica una enfermedad sistémica. Una vez diagnosticada la enfermedad se procede a indicarle un tratamiento. El objetivo del tratamiento es detener el proceso inflamatorio para que las lesiones no crezcan o causen daños adicionales. El grueso de las placas del eritema debe desaparecer, pero la pérdida del cabello y la hipopigmentación de la piel pueden persistir (Jessop et al., 2003).



Linfocitos T reguladores.

Existen varios mecanismos que protegen al individuo contra linfocitos potencialmente autorreactivos; uno de éstos mecanismos es la tolerancia inmunológica (TI). Un mecanismo primario denominado tolerancia central, elimina clonas de células T o B antes de que las células maduren si poseen receptores que reconocen antígenos propios (autorreactivos). Dado que algunos linfocitos autorreactivos logran llegar a los tejidos linfoides periféricos, la participación de otro mecanismo denominado tolerancia periférica torna inactivos o anérgicos a los linfocitos autorreactivos presentes en tejidos linfoides secundarios. Sin embargo, la tolerancia periférica es inducida por linfocitos T reguladores (T_{reg}). Al actuar en tejidos linfoides secundarios y sitios de inflamación, los linfocitos T_{reg} aminoran procesos autoinmunitarios. (Schwartz, 2002) (Fehérvári Z, Sakaguchi S, 2004) (Kind, 2007).

Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* la existencia de defectos en la capacidad reguladora de los linfocitos T_{reg} relacionados con enfermedades autoinmunes y procesos inflamatorios crónicos (Bonelli, Savitskaya, Von Dalwigk, Steiner, Aletaha, Smolen & Scheinecker, 2008; La Cava, 2009).

Los linfocitos T_{reg} son comúnmente categorizados en derivados naturales del timo (nT_{reg}) e inducidos (iT_{reg}). Se ha observado que el 5% de los timocitos expresan $CD4^+$ expresan $CD25^-$. La frecuencia y características funcionales de los timocitos $CD25^+CD4^+CD8^-$ son similares a los linfocitos con el mismo fenotipo encontrados en los linfocitos de sangre periférica (Abdulahad et al., 2011; Dieckmann et al., 2001). La diferenciación de los linfocitos T_{reg} se lleva a cabo en el timo y requiere de la interacción del TCR con el péptido propio presentado por las células estromales del timo. Los corpúsculos de Hassall, presentes en la médula del timo secretan linfopoyetina estromal tímica (TSLP) la cual, activa células dendríticas $CD11c$. Las células dendríticas activadas favorecen la expresión de FOXP3 en timocitos inmaduros con fenotipo $CD4^+CD8^-CD25^+$, lo que favorece su diferenciación hacia linfocitos T_{reg} FOXP3⁺ (Norihiko et. al., 2005.) Una vez diferenciados, los linfocitos T_{reg} tímicos que son liberados a la circulación para el control de respuestas auto-reactivas, son referidas como nT_{reg} . Otro tipo de linfocitos T_{reg} pueden inducirse en la periferia al encontrarse con antígenos extratímicos y un ambiente rico en $TGF-\beta$, a éstos se les denomina adaptativos/inducidos T_{reg} , iT_{reg} (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009).



Como se mencionó, los linfocitos nT_{reg} expresan al factor de transcripción FOXP3, el cual participa directamente en la función de los linfocitos reguladores T $CD4^+$ humanos y murinos. FOXP3 ha sido definido por diversos autores como el gen maestro controlador del desarrollo y función de los linfocitos reguladores y es considerado el principal marcador molecular, de esta subpoblación reguladora; fue descrito inicialmente en ratones “escurfi”, los cuales presentan mutaciones espontáneas en el marco de lectura del gen denominado *Foxp3*. Este gen codifica para la proteína escurfina, cuya deficiencia está asociada a trastornos autoinmunes y linfoproliferativos severos (González Parías et al., 2010). Este factor de transcripción activa un gran banco de genes que median el fenotipo supresor de las T_{reg} y también silencian otros genes efectores de los linfocitos T. (Dang et al., 2011; Sakaguchi et al., 2008).

Se han propuesto diferentes mecanismos de acción por los cuales los linfocitos T_{reg} median la supresión; dentro de los principales se encuentran: a) un mecanismo dependiente de citocinas, especialmente de la IL-10 y TGF- β , en el que los factores solubles con características antiinflamatorias tienen una acción directa sobre la población de linfocitos T efectores o bien un efecto inhibitor sobre las células presentadoras de antígeno (CPA), induciendo de esta manera una respuesta tolerogénica; b) un mecanismo de eliminación por medio de la vía de granzimas – perforinas; c) un mecanismo de competencia en el que las células T_{reg} consumen factores de crecimiento y supervivencia tales como la IL-2 en el microambiente, la ausencia de esta citocina conduce a apoptosis a los linfocitos efectores y finalmente d) a través de la unión de TCR (T_{reg}) y MHC II (CPA) y por la interacción entre el receptor inhibitorio CTLA-4 (T_{reg}) y los receptores CD80/CD86 (CPA) se induce una respuesta negativa que inhibe la maduración y funcionalidad de las CPA (Sakaguchi, Miyara, Costantino & Hafler, 2010).

El LED, como ejemplo de enfermedad autoinmune se debe a una falla de los mecanismos de TI tanto en linfocitos T como B. (Green, Droin & Pinkosk, 2003)



Linfocitos efectores Th17

En el LED, así como en otras enfermedades autoinmunes, la inflamación puede persistir por una falla en los mecanismos que regulan la respuesta inmune. En este sentido, las células Th17 tienen un papel importante en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria en el paciente (Solomon & Magro, 2008; Abdulahad et al., 2011; Murphy et al., 2003).

Se sabe que los linfocitos Th17 son una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ descritos en 2005 y han sido definidos como aquéllos que producen principalmente IL-17A, IL-17F, IL-21, e IL-22. La IL-17, es una potente citocina inflamatoria que amplifica la inflamación local gracias a la inducción de la expresión del factor de necrosis-alfa (TNF- α), IL-1 β e IL-6 (Waite & Skokos, 2012). Además, esta citocina recluta macrófagos y neutrófilos, estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias y péptidos antimicrobianos en una variedad de células tanto inmunes como no inmunes.

Para la diferenciación de los linfocitos Th17 se requiere de la señalización de IL-6, IL-23 e IL-21 (Waite & Skokos, 2012). La IL-6, producida por las células dendríticas activadas es un factor clave que promueve la diferenciación de células Th17 a partir de células T naive. Todas estas citocinas activan a la proteína STAT3, la cual interviene en la regulación de la expresión de la IL-17, IL-21 e IL-23R, así como del factor ROR γ (Abdulahad et al., 2011; Yang et al., 2007; Dang et al., 2011). ROR γ t pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares a esteroides y está relacionado a la subfamilia del receptor de ácido retinoico la cual incluye también a ROR α y ROR β . Sin embargo, cabe señalar que ROR γ t esta expresado únicamente en células del sistema inmune (Ivanov et al., 2006).

En la diferenciación a Th17, si hubiera ausencia de STAT3 dicha diferenciación puede ser parcialmente rescatada por la sobreexpresión de ROR γ t, además aunque STAT3 se une a la mayoría de los genes involucrados en la diferenciación a Th17, también lo hace para los genes involucrados en la supervivencia y proliferación de linfocitos T. Los genes que se unen a ROR γ t, son específicos para el programa de diferenciación de Th17 (Durant et. al., 2010). Sin embargo, algunos linfocitos T pueden co-expresan ROR γ t y FOXP3 en respuesta a TGF- β (Bettelli et.al., 2006). Dependiendo de la interacción entre señales del ambiente tales como las cantidades relativas de IL-6 y TGF- β una u otra población emerge como el fenotipo dominante. Altos niveles de TGF- β en la ausencia de IL-6



induce FOXP3, éste último se puede unir a la proteína de ROR γ t y antagonizar su habilidad de unir ADN, favoreciendo así la diferenciación hacia linfocitos T_{reg}. Por otro lado, citocinas pro-inflamatorias como lo son IL-6 o IL-21 en la presencia de niveles bajos de TGF- β , activan a STAT3 favoreciendo la transcripción de ROR γ t. Lo anterior permite la regulación positiva a través del IL-23R, favoreciendo así la diferenciación de los linfocitos T hacia un fenotipo Th17 (Abdulahad et al., 2011; Dang et al., 2011).

HIF -1 α y el balance T_{reg} / Th17

A pesar de sus diversas funciones, las diferentes poblaciones de linfocitos T se diferencian del mismo grupo de linfocitos T CD4⁺ naive en el momento de la estimulación del antígeno por las citocinas que están presentes en el microambiente (Dang et al., 2011).

El desequilibrio entre los linfocitos T_{reg} y Th17 es apoyado por estudios moleculares que muestran la presencia de interacción recíproca entre ambas poblaciones. Aunque ambas requieren la misma citocina TGF- β 1, durante etapas tempranas de diferenciación, en la presencia de citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , e IL-6, FOXP3 es regulado negativamente y los linfocitos T con fenotipo transcripcional expresan un conjunto de proteínas esenciales para el desarrollo Th17 (por ejemplo ROR γ t e IL-23R) (Kleczynska et al., 2011).

Como se mencionó, juntos IL-6 y TGF- β inducen la expresión de ROR γ t y la diferenciación hacia Th17. A bajas concentraciones, TGF- β presenta actividad sinérgica con IL-6 para promover la diferenciación hacia Th17. Sin embargo, altas concentraciones de TGF- β favorecen a la diferenciación hacia las T_{reg} FOXP3⁺ y la regulación positiva de FOXP3 permite la inhibición de la actividad de ROR γ t (Yang et al., 2011). Por lo tanto, un ambiente inflamatorio controla el equilibrio entre T_{reg} y la diferenciación a linfocitos Th17 (Shi et al., 2011).

Recientemente se describió al factor de transcripción HIF-1 α , el cual es un regulador metabólico que puede participar en la regulación de la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ (Dang et al., 2011).

El factor de transcripción HIF-1 es el principal factor de transcripción activado en condiciones de hipoxia, la cual se describe como la falta de oxígeno tisular y se presenta cuando los niveles de



oxígeno son menores a los requeridos para el mantenimiento fisiológico de la tensión de O_2 en los tejidos (Höpfl et al., 2003).

HIF-1 se compone de dos subunidades, la subunidad alfa (HIF-1 α) y la subunidad beta (HIF-1 β), es la subunidad inducible en hipoxia, tiene una vida media de 1-2 minutos en condiciones de normoxia. En condiciones de hipoxia la acumulación de HIF-1 α en el citoplasma provoca su traslocación hacia el núcleo en donde se une a HIF-1 β y a otros cofactores, este complejo reconoce las secuencias TACGT, que son elementos de respuesta a hipoxia presentes en las regiones promotoras de una gran cantidad de genes que regulan diversos procesos como: metabolismo energético, angiogénesis, tono vascular, migración celular, metástasis, entre otros (Aquino A, González G, 2011)

Sin embargo, en los últimos años se han generado evidencias de que HIF-1 α es regulado en procesos de inflamación (Stasinopoulos et al., 2009; Sharma et al., 2011).



ANTECEDENTES

Linfocitos T_{reg} en Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

Los linfocitos T_{reg} tienen participación en enfermedades como LES. La falta de función de esta población celular así como una disminución en números de ella, se encuentra vinculada con el desarrollo de autoinmunidad. (Campbell & Koch, 2011; Buckner, 2011). En el caso específico de esta enfermedad se han encontrado números reducidos de T_{reg} tanto en modelos murinos como en pacientes con LES comparados con controles sanos (Bonelli et al., 2008; Alunno et al., 2012). Además se ha encontrado que los linfocitos T_{reg} no se encuentran distribuidos en los sitios de actividad de la enfermedad o en órganos linfoides. Asimismo existe una correlación inversa entre la proporción de linfocitos T_{reg} y el deterioro causado por la enfermedad independientemente de los órganos que se encuentran implicados (Miyara et al., 2005).

El estudio del grupo de trabajo de Bonelli revela la presencia de linfocitos T_{reg} en pacientes con LES, sin embargo, existen trabajos que demuestran una deficiencia en la función de los linfocitos T_{reg} en los pacientes con LES lo que podría repercutir en una falla del control de la autoinmunidad. (Bonelli et al., 2008).

Linfocitos Th17 en LES

Se ha observado en varios grupos de pacientes con LES incluyendo a pacientes de nuevo inicio de la enfermedad, un incremento en el porcentaje de células Th17 y elevadas concentraciones de IL-17A en suero y plasma así como infiltración de linfocitos Th17 en los órganos afectados por LES, como los riñones (Bălănescu et al., 2010). Los linfocitos Th17 pueden infiltrar la piel, pulmones y riñones en pacientes con lupus (Yang et al., 2011).

También se sabe que en las enfermedades autoinmunes y en este caso en el LED, los linfocitos Th17 tienen un papel importante en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria en el paciente (Solomon & Magro, 2008; Kleczynska et al., 2011).

Tomando en cuenta estas referencias previas, se puede señalar que los linfocitos Th17 participan mediación de daño del órgano blanco principalmente en la destrucción de tejidos, tanto en etapas tempranas como tardías de la enfermedad (Kwan et al., 2009).



Balance T_{reg}/ Th17

Shi et al, señalan que en la diferenciación de los linfocitos Th17 es requerido el factor de transcripción HIF-1 α , por lo que al evaluar a linfocitos HIF-1 α ^{-/-} se observó una reducción de la expresión de IL-17 así como un incremento recíproco en los niveles de FOXP3, aunque el experimento se encuentre bajo condiciones Th17 polarizantes. Lo anterior va de acuerdo con que la dicotomía de los linfocitos Th17 y T_{reg} es dependiente de las condiciones inflamatorias, especialmente de la concentración de IL-6. Estos trabajos demuestran que HIF-1 α es requerido para promover la diferenciación celular a Th17 pero inhibe la inducción de los linfocitos T_{reg}. Este grupo de trabajo estudió los niveles de glicólisis en los linfocitos diferenciados, observando que todos los linfocitos realizan glicólisis, sin embargo los linfocitos T_{reg} lo hacen en niveles bajos. Por medio de un western blot detectaron a la proteína HIF-1 en los linfocitos Th17 así como también detectaron niveles elevados de moléculas relacionadas con la glicólisis en este tipo de linfocitos. Por lo tanto ellos sugieren que HIF-1 α sirve como punto de control metabólico, para distinguir el destino entre dos linajes celulares estrechamente relacionados. (Shi et al., 2011).

Así mismo, el grupo de trabajo de Dang, demuestra que HIF-1 α promueve el desarrollo hacia Th17 a través de una transcripción directa de ROR γ t y una colaboración directa con ROR γ t para activar genes que lleven a un destino Th17. Se conoce que HIF-1 α es un sensor importante de la tensión de oxígeno que media a la fosforilación oxidativa y la glicólisis anaeróbica en respuesta a hipoxia (Semenza, 2007); y la diferenciación hacia Th17 aumenta en virtud de una hipoxia de manera HIF-1 α dependiente. Con relación a ello, varios estudios han demostrado que los ambientes inflamatorios son relativamente hipóxicos. Estos autores proponen que HIF-1 α puede ser activado mediante factores como IL-6; los niveles de HIF-1 α estarían regulados por la tensión de oxígeno y otros metabolitos. HIF-1 α activa la transcripción del gen Rorc y, además, recluta a p300 y a ROR γ t en los genes promotores de Th17. Estas actividades promueven la diferenciación hacia Th17. Al mismo tiempo, HIF-1 α induce la degradación de la proteína FOXP3 a través de su señalización para su ubiquitinación y degradación proteosomal (Dang et al., 2011).

No obstante, el grupo de trabajo de Ben – Shoshan indica que existe una relación entre HIF-1 α y la homeostasis de los linfocitos T_{reg} ya que se ha visto que un ambiente hipóxico aumenta la expresión de FOXP3 en esplenocitos de ratón y linfocitos mononucleares humanos de sangre periférica y que



la transfección de HIF-1 α en linfocitos de ratón resultó en un aumento de la expresión de FOXP3 tanto *in vivo*, como *in vitro* (Ben – Shoshan et al., 2008).

De acuerdo con lo anterior, Clambey et. al., señalan que particularmente durante el ambiente inflamatorio hipóxico, HIF-1 α dependiente de transcripción puede activar múltiples mecanismos anti-inflamatorios. Un ejemplo de ello es la inducción coordinada de la ruta de adenosina extracelular, una ruta que en contexto de linfocitos T puede promover la diferenciación hacia linfocitos T_{reg} a través de tres mecanismos distintos: (i) la activación transcripcional directa de mRNA de FOXP3 después de una hipoxia temprana, (ii) una hipoxia conducida de manera dependiente de TGF- β , necesaria para la inducción hipóxica completa de mRNA de FOXP3 y proteínas después de la activación de linfocitos T y su diferenciación y (iii) un papel T_{reg} intrínseco para HIF-1 α , el cual se requiere para una óptima función supresora de los linfocitos T_{reg} *in vivo* e *in vitro*. Además, este grupo de trabajo menciona que el promotor de FoxP3 posee sitios de unión a HIF-1 α y que en condiciones de hipoxia promueve la abundancia y función de los linfocitos T_{reg} (Zarek et al., 2008; Clambey et al., 2012).

En estado de salud, la respuesta Th17 puede ser efectivamente controlada por los linfocitos T_{reg}. Sin embargo la depleción condicional de FOXP3 en ratones adultos resulta en la expresión tanto de ROR γ t como de IL-17 (Korn et al., 2009). Por otra parte, en estudios anteriores se ha visto una disminución del porcentaje de la población de linfocitos T_{reg} y un incremento en el porcentaje de la población de linfocitos Th17 en enfermedades autoinmunes (por ejemplo en la enfermedad de Crohn, colitis y artritis reumatoide). Particularmente en LES, el grupo de trabajo de Yang señala que en pacientes con LES activo se ha encontrado un incremento en la población de linfocitos Th17 y una disminución de linfocitos T_{reg} con una correlación negativa entre ambas poblaciones en sangre periférica (Yang et. al., 2009)

En cuanto a linfocitos T_{reg} se refiere Kleczynska et.al., observaron una disminución cuantitativa de linfocitos T_{reg} en comparación con sujetos sanos, sin embargo, ellos no notaron diferencias significativas en la frecuencia de linfocitos Th17 entre pacientes con LES y controles sanos (Kleczynska et al., 2011). Tomando en conjunto estas evidencias, se sugiere que el balance de las poblaciones de linfocitos Th17/T_{reg} parece ser determinante en el curso de distintas enfermedades autoinmunes incluyendo el LES.



Inmunidad en Lupus Eritematoso Cutáneo

La exposición a la luz UV es considerado como un desencadenante para lesiones en LEC. La luz UV induce la liberación de citocinas y la apoptosis de queratinocitos en tejidos cutáneos. Los factores pro-inflamatorios liberados en la piel expuesta a la luz UV incluyen: $TNF\alpha$, IL-6, IL-1 entre otros. Las células apoptóticas no fagocitadas liberan compuestos pro-inflamatorios y potenciales autoantígenos que pueden contribuir a generar un micro-ambiente pro-inflamatorio que conduce a la formación de lesiones cutáneas. INF-1 se encuentra en las lesiones cutáneas, el cual también actúa como una citocina pro-inflamatoria; es liberada por células dendríticas plasmacitoides (pCD) y células dendríticas convencionales (cCD) que se encuentran en la piel de los pacientes con LEC y las cuales emigraron de circulación. Las lesiones cicatrizantes en piel de LED están caracterizadas por altos números de linfocitos citotóxicos residentes de piel asociados con una fuerte expresión de INF - 1. Las quimiocinas inducibles por $INF-\gamma$ e $INF-\beta$: CXCL9, CXCL10 y CXCL11 son expresadas fuertemente en las lesiones en epidermis de pacientes con LEC, éstas contribuyen al reclutamiento de linfocitos efectoros CXCR3⁺ (Wenzel, Zahn & Tüting, 2010). Adicionalmente, las pCD, que también expresan CXCR3 migran a la piel inflamada, donde el INF-1 local (secretado por queratinocitos) las estimula para producir más INF, perpetuando así el proceso inflamatorio (Johnson – Huang et al., 2010; Wenzel et al., 2010). Esto contribuye fuertemente a la hiperactividad de linfocitos T y B característica de esta enfermedad. Un desequilibrio entre CDs inmunogénicas y tolerogénicas en LEG probablemente limita la expansión de linfocitos T_{reg} lo que puede contribuir a la disminución en el número de dichas células. (Horwitz, 2008).

Al analizar cuantitativa y cualitativamente a los linfocitos T_{reg} FOXP3⁺ en enfermedades autoinmunes, los hallazgos de algunos grupos de trabajo son contradictorios; Suen et al., encontraron una frecuencia significativamente mayor de linfocitos T CD4⁺FOXP3⁺ en pacientes con LES, en comparación con controles sanos (Suen, et al., 2009); el grupo de trabajo de Liu et al., señala que la frecuencia de linfocitos T_{reg} FOXP3⁺ circulantes es significativamente mayor sólo en pacientes que inician con LES, a comparación con controles sanos (Liu et al., 2011). Sin embargo al analizar sólo la expresión de FOXP3 en tejidos de pacientes afectados por LES y dermatomiositis, se encontró una baja o nula expresión de FOXP3 en comparación con controles sanos (Solomon & Magro, 2008).



En pacientes con LECS, se observó una baja expresión de linfocitos FOXP3⁺ en el infiltrado celular de dermis en lesiones a diferencia de lesiones de otras enfermedades inflamatorias de la piel como son: dermatitis atópica y eczema (Franz et al., 2007).

Cabe señalar que la expresión de este marcador no ha sido reportada en lesiones de LED. Tampoco se conoce si existe expresión de HIF-1 α en lesiones de dicha enfermedad y si tiene un papel regulador en el factor de transcripción FOXP3, específicamente en esta enfermedad.



ANTECEDENTES DIRECTOS AL TRABAJO

En un trabajo previo realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional SXXI se evaluó la expresión de HIF-1 α en lesiones de Linfoma Cutáneo de Células T (LCCT), encontrándose expresión en los linfocitos de dichos pacientes. Cabe señalar que la expresión de HIF-1 α correlaciona con la severidad de la enfermedad.

De igual forma, se analizó la expresión de FOXP3 en biopsias de lesiones cutáneas de los pacientes y se encontró menor porcentaje de núcleos positivos comparado con los controles sanos. Al realizar un análisis de la expresión de IL-17 y ROR γ t en las mismas muestras se encontró una sobreexpresión de estas moléculas en las lesiones de los pacientes con LCCT comparando con los controles sanos.

Además también se encontró que la expresión de HIF-1 α y FOXP3 en la piel de los pacientes, correlacionan de manera inversa, lo que sugiere de acuerdo a los antecedentes que HIF-1 α pudiera estar favoreciendo la degradación de FOXP3. También se realizaron experimentos con cultivos de piel de pacientes con LCCT a los que se les agregaron drogas que evitan específicamente la degradación de HIF-1 α , y se observó un incremento significativo en la frecuencia de linfocitos FOXP3⁺, lo que confirma que HIF-1 α tiene la capacidad de regular la expresión de FOXP3 en los linfocitos de la piel de pacientes con LCCT.

Estos resultados sugieren que HIF-1 α tiene un papel importante en el control de la frecuencia de linfocitos FOXP3⁺ y, por tanto, pueda tener un papel en el equilibrio Th17/T_{reg} en las lesiones de pacientes con LCCT, disminuyendo la frecuencia de linfocitos T_{reg}.



JUSTIFICACIÓN

El Lupus Eritematoso Discoide es una enfermedad autoinmune crónica de etiología desconocida, en la que se conoce que factores inmunológicos juegan un papel importante en la patogénesis. Se sabe que este padecimiento es una enfermedad autoinmune localizada, de ahí que sea factible analizar el papel que diversos factores de transcripción expresados por distintas poblaciones celulares en esta enfermedad. También existen evidencias de la intervención de inmunidad celular en esta enfermedad, sin embargo, cabe señalar que ésta aún no se encuentra caracterizada.

Existen evidencias que muestran que el balance de las poblaciones celulares Th17/T_{reg} se encuentra alterado en enfermedades autoinmunes; esta situación tiene relevancia clínica en dichas enfermedades. Sin embargo no se conoce como se encuentran estas poblaciones celulares en LED y si pudieran contribuir o no a la patogénesis de dicho padecimiento.

Por lo anterior resulta necesario determinar si en las lesiones de pacientes con LED hay presencia de linfocitos T_{reg} y Th17, cómo se encuentra el equilibrio Th17/T_{reg} y el papel de HIF-1 α como potencial regulador de estas poblaciones celulares y poder contribuir así, con nueva información que nos ayude a comprender el desarrollo y la patogenia de esta enfermedad autoinmune.



HIPÓTESIS

- ✓ La expresión de FOXP3 se encontrará disminuida y la expresión de ROR γ t se encontrará aumentada en las lesiones de los pacientes con LED en comparación con controles sanos.
- ✓ El factor de transcripción HIF-1 α se expresará en las lesiones de los pacientes con LED y correlacionará positivamente con la expresión de ROR γ t y negativamente con la expresión de FOXP3.

OBJETIVOS

- ✓ Evaluar la expresión de FOXP3 y ROR γ t en lesiones de pacientes con LED y en individuos sanos.
- ✓ Evaluar la expresión de HIF-1 α en lesiones de pacientes con LED así como correlacionar su expresión con la de FOXP3 y ROR γ t.



METODOLOGÍA

- UNIVERSO DE TRABAJO

Los pacientes fueron derivados de la consulta externa de la clínica de Colagenopatías del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua y del Hospital General de México. Al inicio de la consulta, se revisaron los expedientes clínicos con el fin de identificar a los pacientes elegibles y corroborar su diagnóstico de LED. En caso de ser pacientes elegibles, se les preguntó si aceptaban participar en el estudio y con previo consentimiento informado se les tomó una biopsia en el momento.

- CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

Inclusión

Pacientes mayores de 15 años, de cualquier género, con lupus cutáneo crónico, en particular, LED, con una evolución de la enfermedad de 6 meses, que no se encontraran recibiendo tratamiento inmunosupresor, ni sistémico, ni tópico, o pacientes con diagnóstico previo que hayan presentado recaída del componente cutáneo.

Con la finalidad de disminuir la inclusión de pacientes con diagnóstico semejante a LED, todos los casos deben estar previamente documentados con estudio histopatológico.

Exclusión

Pacientes que hayan sido diagnosticados con LED y que 6 meses posteriores a la toma de la muestra y biopsia hayan progresado a LEG o que inicien con alguna otra patología reumatológica.

- PROCEDIMIENTOS

Los pacientes diagnosticados con LED y que aceptaran participar en el estudio, se les solicitó su consentimiento por escrito y se procedió a tomarles una biopsia de la lesión con sacabocados de 4, 5 ó 6 mm. A ninguno de los pacientes se les solicitó que asistiera con alguna preparación especial.

Todos los pacientes con LED fueron documentados con fotografías de las lesiones, cuidando el anonimato de los pacientes.



La expresión de diversos marcadores en la biopsia de los pacientes requiere ser controlada con muestras de sujetos sanos, se requirió de un segundo grupo de donadores de tejido (piel). La muestra fue obtenida del tejido sobrante de sujetos sometidos a cirugía plástica, este tejido fue utilizado como control interno de los experimentos y fue obtenido de las cirugías del Centro Dermatológico Pascua.

⌘ Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos que se utilizaron para las tinciones de inmunohistoquímica fueron los siguientes:

- Anticuerpo policlonal anti-FOXP3 (V – 17) hecho en cabra (Santa Cruz, Biotechnology).
- Anticuerpo policlonal anti -HIF-1 α , hecho en conejo (Novus biologicals).
- Anticuerpo policlonal anti-ROR γ t, hecho en conejo (Novus biologicals).

Los reactivos utilizados en las tinciones de inmunohistoquímica fueron:

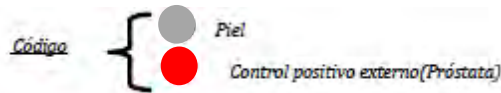
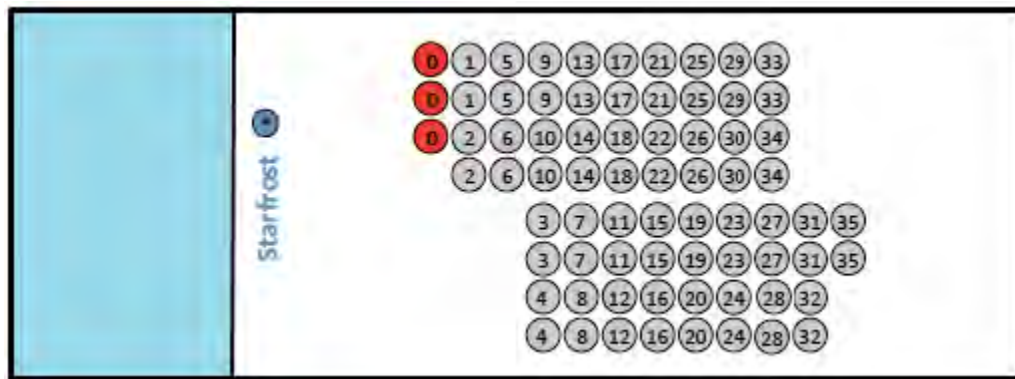
- Universal LSAB™ (DAKO) + Kit/HRP, Rabbit/Mouse/Goat (DAKO)
- DAB+Liquid (DAKO)
- Medio Shandon Mount – Z (Thermo)

⌘ Construcción del microarreglo de tejido.

Se obtuvieron biopsias de lesiones cutáneas de pacientes con LED por medio de un sacabocados de 4, 5 o 6 mm dependiendo del sitio donde se localizara la lesión. Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 4% por 24 horas y posteriormente se sometieron a un proceso de deshidratación para ser incluidos en parafina. Para poder analizarlos histológicamente, se prepararon laminillas de cortes seriados de 4 μ m utilizando un micrótopo rotatorio modelo Slee Mainz (Alemania). De estos, se hicieron tinciones de Hematoxilina – Eosina (H/E) para observar la estructura de la piel, un dermatólogo experto en LED, seleccionó el área representativa de cada una de las muestras. También se obtuvo piel de individuos sanos los cuales de utilizaron como controles. La construcción del microarreglo de tejido se realizó a partir de las áreas seleccionadas de pacientes y controles, extrayendo cilindros obtenidos de los bloques de los pacientes e individuos sanos. Una vez obtenida una matriz de 35 muestras por duplicado se impregnó el bloque con una



pequeña cantidad de parafina líquida para igualar la altura de los cilindros. Se homogeneizó el bloque calentando en un horno a 60° C por 15 minutos, de éste, se realizaron cortes seriados de 4 µm con el micrótopo rotatorio. En la siguiente figura se muestra el mapa de microarreglo, en el cual fueron incluidas 20 biopsias de pacientes con LED, 8 biopsias de pacientes con psoriasis y 7 controles sanos.



1) LED - 001	8) LED - 009	15) LED - 016	22) PS - 02	29) S - 001
2) LED - 002	9) LED - 010	16) LED - 017	23) PS - 03	30) S - 002
3) LED - 003	10) LED - 011	17) LED - 018	24) PS - 04	31) S - 003
4) LED - 004	11) LED - 012	18) LED - 019	25) PS - 05	32) S - 004
5) LED - 005	12) LED - 013	19) LED - 020	26) PS - 06	33) S - 005
6) LED - 007	13) LED - 014	20) LED - 024	27) PS - 07	34) S - 006
7) LED - 008	14) LED - 015	21) PS - 01	28) PS - 08	35) S - 009

Figura 3. Mapa del Microarreglo en el que se muestra la disposición que ocupa cada uno de los pacientes y controles obtenidos. LED: Pacientes con Lupus Eritematoso Discoide; PS: pacientes con Psoriasis y S: Controles Sanos.



⌘ Tinciones de inmunohistoquímica.

Se realizaron tinciones de inmunohistoquímica para los marcadores FOXP3, HIF1 α y ROR γ t en cortes seriados de 4 μ m del microarreglo.

Una vez que se tienen los cortes a usar, estos se colocaron en una estufa a una temperatura de 60° C para fundir la parafina de los cortes seriados. Posteriormente los cortes fueron hidratados por soluciones de xiloles y etanoles. Al término de esta hidratación, las laminillas se transfirieron a Jarras de Coplin de propileno de alta densidad con una solución de citrato de sodio 0.01M a un p.H. de 6.0 para el desenmascaramiento de antígeno y se pusieron a ebullición en un baño de vapor a 90 °C por 4 minutos. Para inhibir la actividad de peroxidasa endógena propia de las muestras se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno al 10% en metanol durante 20 minutos y con agitación constante.

Una vez concluida la inhibición se procedió a incubar las laminillas con una solución bloqueadora de leche-albúmina al 10% para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos empleados durante un lapso de 1 hora y 30 minutos. Posteriormente se agregó el anticuerpo primario al área de cortes del microarreglo y se dejó en incubación en una cámara húmeda a temperatura ambiente. La incubación fue de 18 horas para cada uno de los anticuerpos. Los anticuerpos utilizados para identificar los marcadores que expresan las poblaciones celulares que se encuentran infiltrado la zona de epidermis de los pacientes fueron: HIF – 1 α , FOXP3 y ROR γ t en una dilución de: 1:250, 1:500 y 1:100 respectivamente.

Al día siguiente, las laminillas con los microarreglos fueron incubadas con el reactivo link universal biotinilado (cóctel de anticuerpos biotinilados anti-ratón, anti-conejo y anti-cabra) a temperatura ambiente, seguida de una incubación con estreptavidina conjugada con HRP a temperatura ambiente. Cabe señalar que ambas incubaciones se realizaron en una cámara húmeda durante 30 minutos cada una. Para desarrollar el color se utilizó 3, 3 tetra-hidrocloruro diaminobencidina (DAB) y al final la reacción fue interrumpida con agua; el tejido se contratiñó con Hematoxilina por 20 segundos y fue deshidratado mediante baños consecutivos de etanol y xileno. Para su conservación se utilizó el medio Mount E - 2 para su posterior análisis.



⌘ Análisis de la expresión de marcadores en los microarreglos.

El análisis de la expresión de cada marcador en los microarreglos se llevó a cabo mediante un sistema analizador de laminillas llamado Aperio ScanScope (Aperio). Las laminillas con los microarreglos se escanearon en el dispositivo ScanScope CS. Posteriormente se analizaron los spots correspondientes a los pacientes de lupus y controles sanos con la ayuda del software Aperio ImageScope v.11.02.725 (Aperio) seleccionando un área correspondiente a la dermis de $3000 \pm 500 \mu\text{m}^2$. Los algoritmos seleccionados para el análisis en cada marcador fueron: Aperio Positive Pixel Count para el conteo de píxeles y Aperio Nuclear Algorithm para el conteo de núcleos. Los criterios utilizados para realizar dichos análisis fueron los siguientes:

- Tamaño mínimo nuclear: 10 micras cuadradas
- Tamaño máximo nuclear: 10000 micras cuadradas
- Tendencia de curvatura: 0.5 micras

Tanto el algoritmo Aperio Positive Pixel Count como el algoritmo Aperio Nuclear Algorithm presentan 3 niveles de positividad: alta, media y baja. En todos los análisis la intensidad baja no fue tomada en cuenta con el fin de evitar la tinción inespecífica de fondo.

Cabe señalar que aunque en el microarreglo de tejido se incluyeron muestras obtenidas de pacientes con psoriasis, estas muestras no se incluyeron en el análisis ni en la presentación de resultados.



⌘ Análisis estadístico

De los valores obtenidos de cada spot de pacientes con LED y de cada individuo normal, se obtuvo la media. La información se procesó y se realizó el análisis estadístico por medio del programa estadístico GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego CA) por medio de una prueba Mann - Whitney para datos no paramétricos, una $p < 0.05$ fue considerada como significativa.

Para los análisis de correlación se utilizaron los datos obtenidos de cada spot de pacientes con LED y de cada individuo normal. De igual forma que para el análisis anterior, para éste también se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism por medio de la prueba de Pearson donde un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.



RESULTADOS

I. RECLUTAMIENTO DE PACIENTES

Se reclutaron 20 pacientes con LED. En la siguiente tabla se describen sus características clínicas.

Tabla 2. Características de los pacientes reclutados.

Paciente	Género	Edad	No. de lesiones	Tiempo de evolución (años)
1	F	37	1	1
2	M	18	9	1
3	M	15	2	1
4	M	21	3	1
5	F	21	-----	3
6	F	15	4	3
7	F	15	4	1
8	F	49	2	-----
9	F	46	1	5
10	F	28	-----	5
11	F	71	1	6
12	F	50	6	32
13	F	55	6	20
14	F	16	1	11
15	F	15	2	6
16	F	27	8	2
17	F	21	-----	-----
18	F	36	3	7
19	F	21	4	8
20	F	47	16	8

Cabe señalar que ningún paciente recibió tratamiento previo a la toma de la biopsia. También se obtuvieron 7 muestras de sujetos sometidos a cirugía plástica como controles internos del experimento.



II. EVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ROR γ t *in situ*

Se observó la presencia de linfocitos ROR γ t positivos en el infiltrado inflamatorio de las lesiones (Figura 4). En el aumento 20X observamos una zona del infiltrado celular de un spot de un paciente con LED y en el aumento 40X observamos a mayor aumento la presencia de linfocitos ROR γ t⁺. Estos mismos aumentos se utilizaron para observar la muestra de un individuo normal (control) representativo.

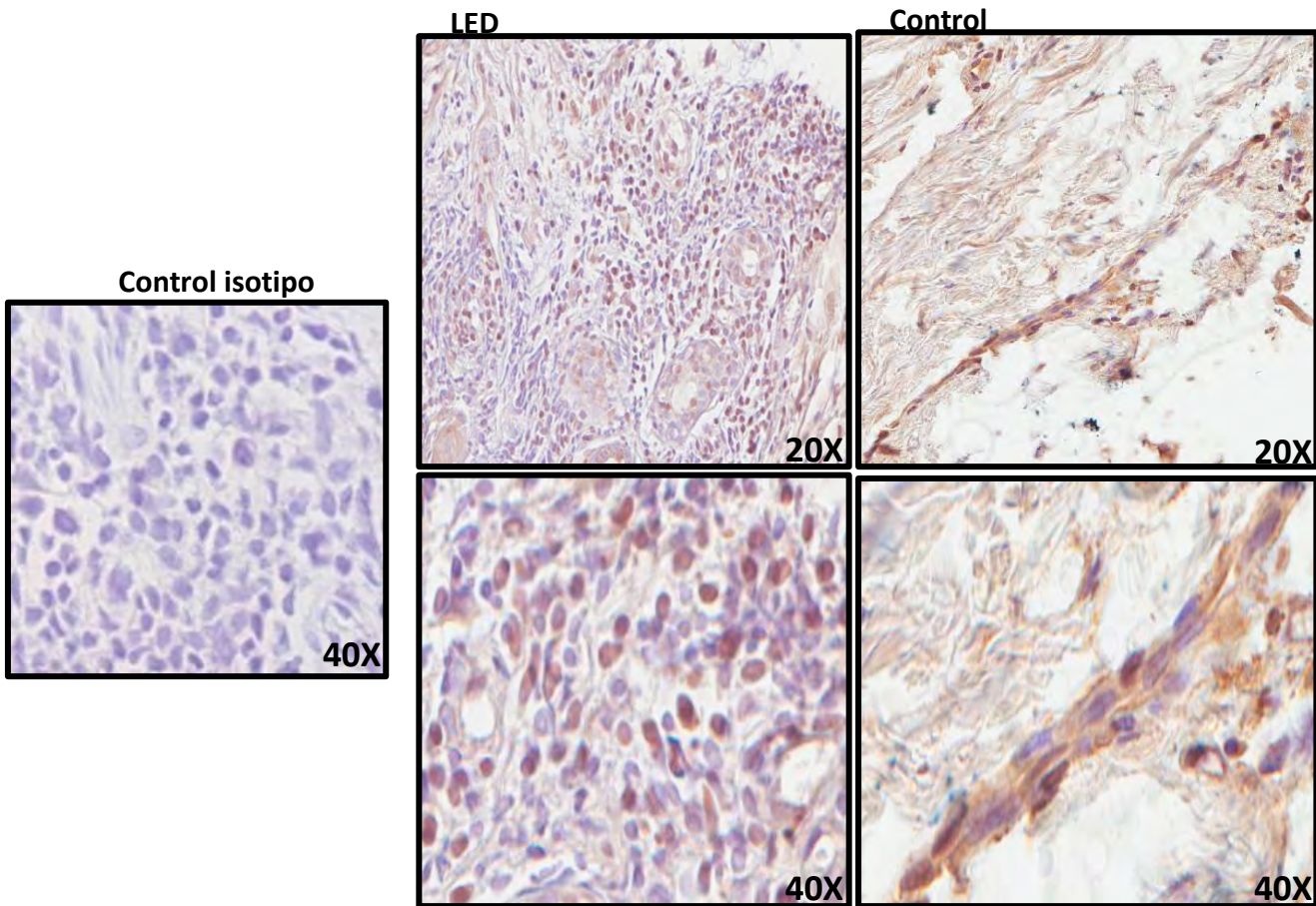
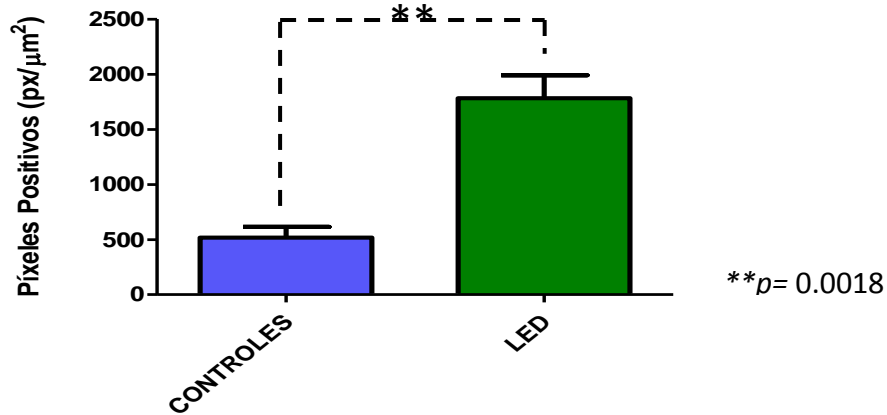


Figura 4. Diferencias en la expresión de ROR γ t en el microarreglo de tejido de biopsias de pacientes con LED e individuos normales. La positividad de las células está representada por una tinción café de las mismas. Se muestra una imagen representativa del control de isotipo, de un paciente con LED y de un individuo sano en aumentos de 20X y 40X.

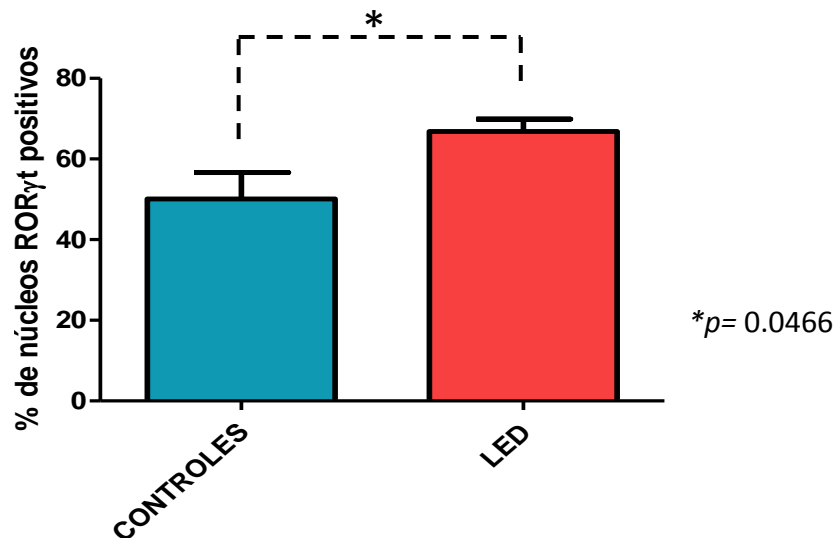


El análisis cuantitativo de la expresión de ROR γ t muestra un aumento en la expresión del marcador ROR γ t en las biopsias de los pacientes con LED en comparación con la piel sana. (Gráfica 1)



Gráfica 1. La expresión de ROR γ t cuantificada por la cantidad de píxeles positivos es mayor en pacientes con LED que en los controles normales. Se graficó la cantidad de píxeles positivos, calculada en base a la densidad de expresión por un área determinada de $3000 \pm 500 \mu\text{m}^2$ en el microarreglo del tejido de pacientes con LED (barra verde) e individuos control (barra azul).

Así mismo, se cuantificaron los núcleos positivos para ROR γ t. El análisis muestra una mayor expresión de ROR γ t en los pacientes con LED que en los controles de individuos normales. (Gráfica 2).



Gráfica 2. El porcentaje de núcleos positivos para ROR γ t es mayor en pacientes con LED que en los controles de individuos sanos. Basándose en el área previamente seleccionada para la cuantificación de píxeles positivos se cuantificaron tanto los núcleos positivos como totales para pacientes con LED (barra roja) y controles normales (barra azul) en el microarreglo de tejido.



III. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE FOXP3 EN EL MICROARREGLO DE MUESTRAS DE TEJIDO.

Se realizó la tinción de Inmunohistoquímica para el anticuerpo FOXP3 con la finalidad de observar la expresión de éste tanto en el tejido de los pacientes con LED como en los individuos control. Se encontró la presencia de linfocitos infiltrantes ROR γ t⁺ en las biopsias de pacientes con LED y de controles normales (Figura 5).

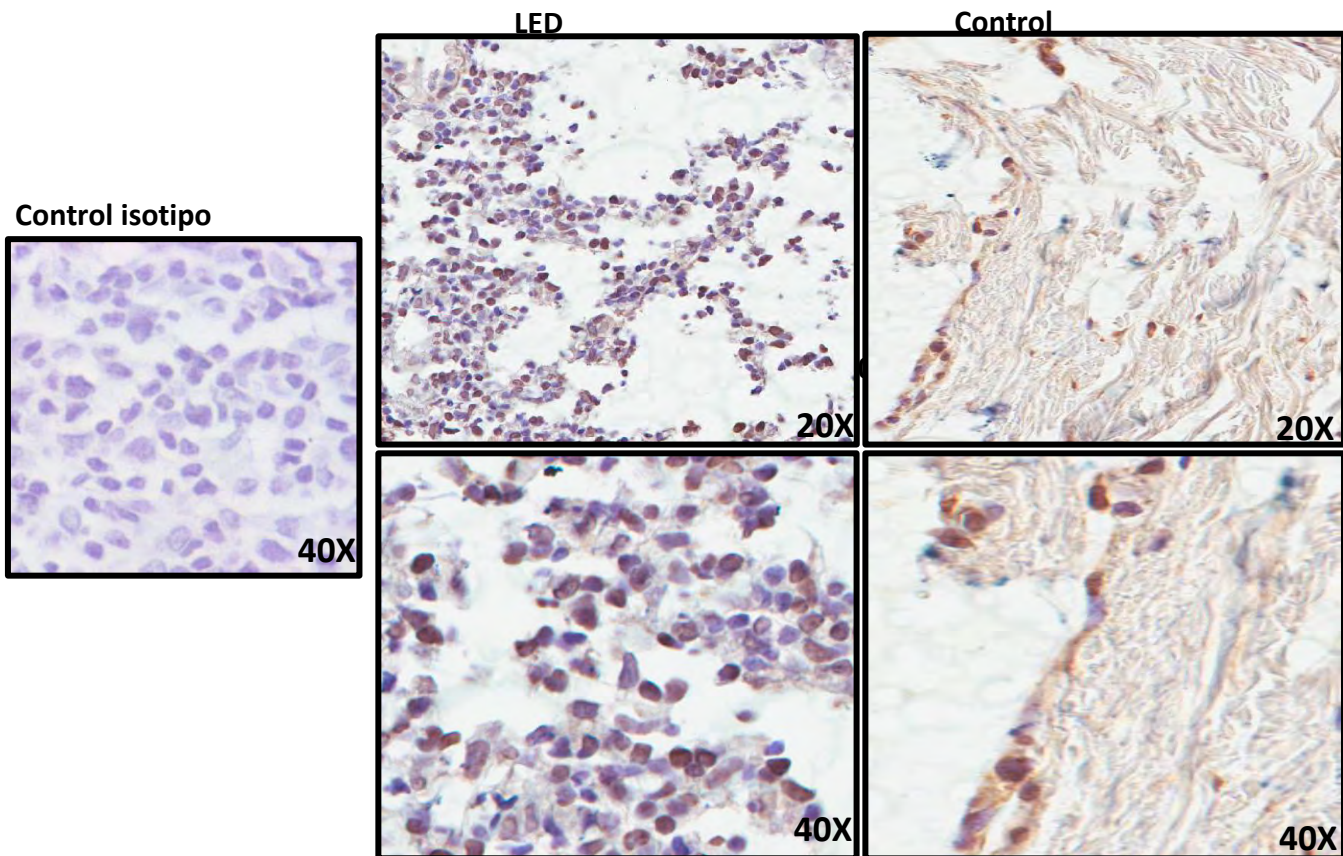
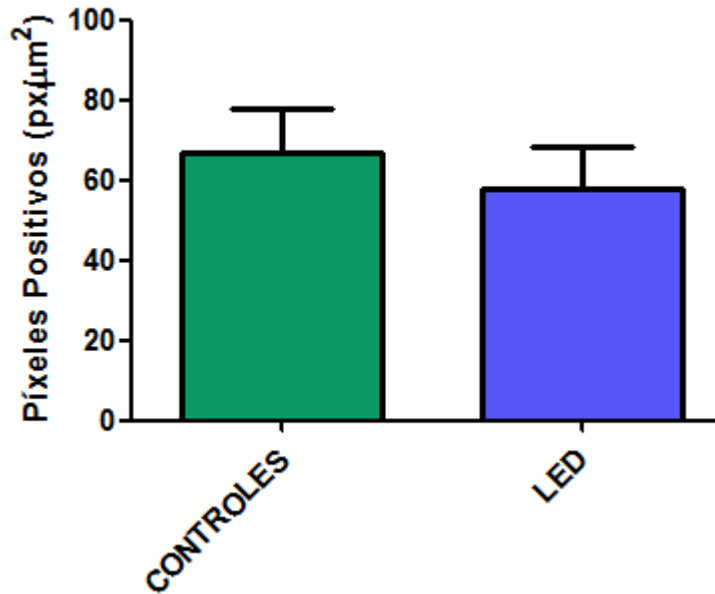


Figura 5. Células FOXP3⁺ se encuentran tanto en el infiltrado de las lesiones de LED como en controles individuales. La figura muestra la expresión de FOXP3 representada por la coloración café de las células presentes en las biopsias. Las imágenes presentan una imagen representativa tanto del control positivo, un paciente con LED y un control normal. El color se desarrolló con DAB y se contratiñó con Hematoxilina.



El análisis cuantitativo de la densidad de expresión de FOXP3, calculado en base a la intensidad de la tinción de color café, muestra un ligero aumento en la expresión de FOXP3, sin llegar a ser significativo en las biopsias de los pacientes con LED en comparación de los individuos control con piel sana (Gráfica 3).

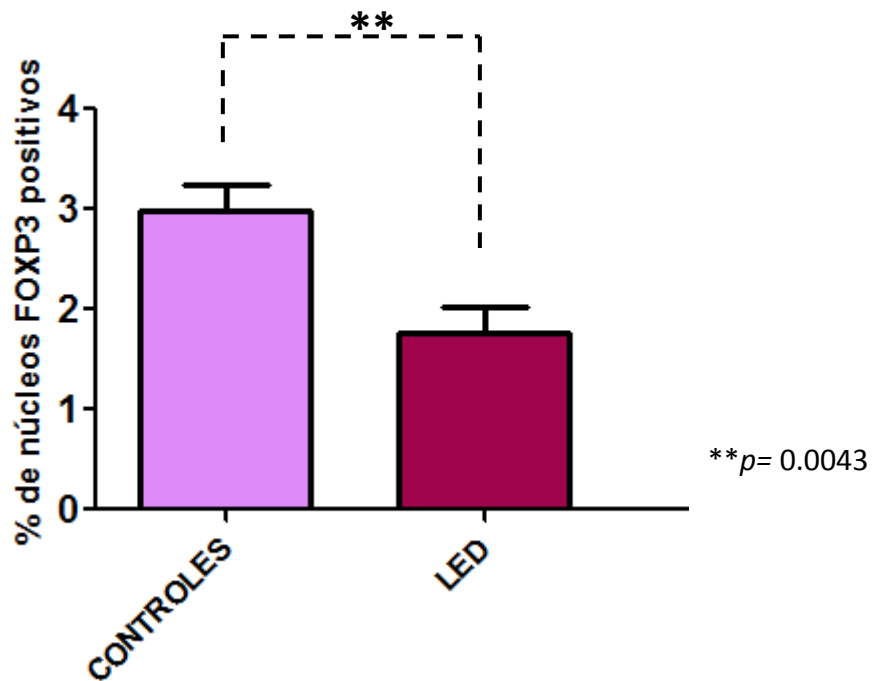


Gráfica 3. No existe diferencia en la expresión de FOXP3 medida por píxeles positivos en pacientes con LED e individuos control. Se graficó la cantidad de píxeles positivos para pacientes con LED (barra azul) y controles normales (barra verde) en un área determinada de $3000 \pm 500 \mu\text{m}^2$ en el microarreglo de tejido.

Con la finalidad de conocer la expresión nuclear de FOXP3 de los pacientes con LED y de los controles sanos también se realizó el análisis nuclear de los spots de pacientes con LED y controles sanos del microarreglo de tejido en el cual se cuantificaron tanto los núcleos positivos como los totales.



Al realizar el análisis nuclear en los spots de pacientes con LED y de controles sanos se encontró un aumento en el porcentaje de núcleos positivos para FOXP3 en las biopsias de piel sana en comparación con las lesiones de los pacientes con LED (Gráfica 4).



Gráfica 4. La expresión nuclear de FOXP3 es mayor en los individuos control que en los pacientes con LED. Se graficó el porcentaje de núcleos para los individuos sanos (barra lila) y para los pacientes con LED (barra vino). El área analizada es la misma que la utilizada para el análisis cuantitativo de pixeles.



IV. EVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE HIF - 1α *in situ* EN BIOPSIAS DE LESIONES DE LED

Con la finalidad de observar si había la expresión de HIF- 1α en las muestras de tejido de pacientes con LED se realizó una tinción de Inmunohistoquímica con dicho anticuerpo en el microarreglo de tejido.

Se encontraron linfocitos que expresan positividad para HIF- 1α tanto en el infiltrado celular para pacientes con LED como en individuos sanos, sin embargo se encuentran en mayor cantidad en las lesiones de pacientes con LED (Figura 6).

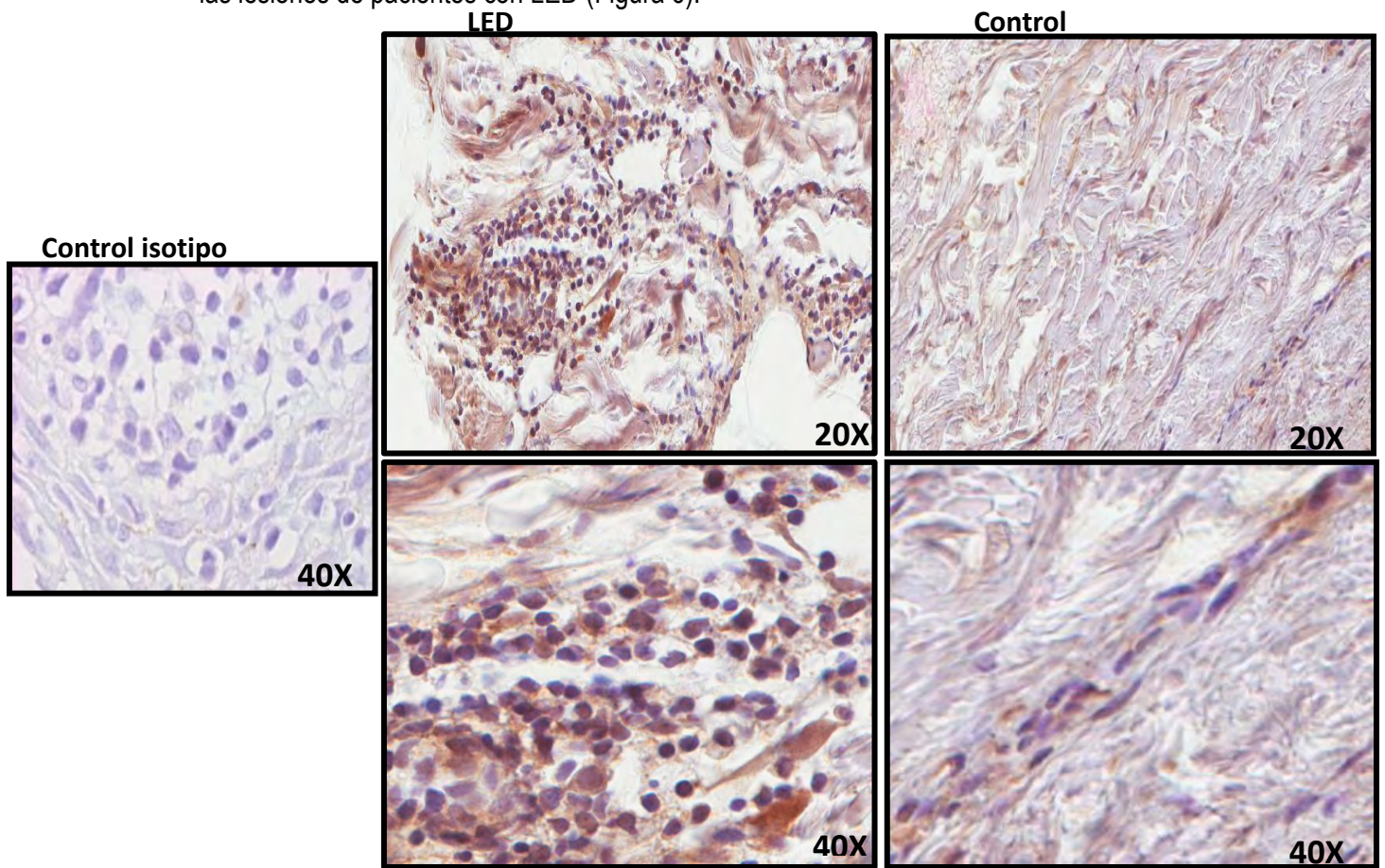
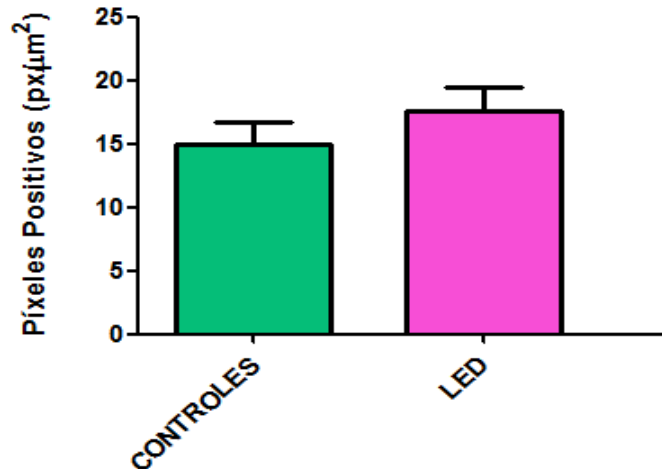


Figura 6. Células HIF-1 α + se encuentran infiltrando las lesiones en pacientes con LED. La figura muestra imágenes representativas del control de isotipo, un paciente con LED y un control normal; la positividad está representada por la coloración café desarrollada con DAB. La contratinción se realizó con Hematoxilina.

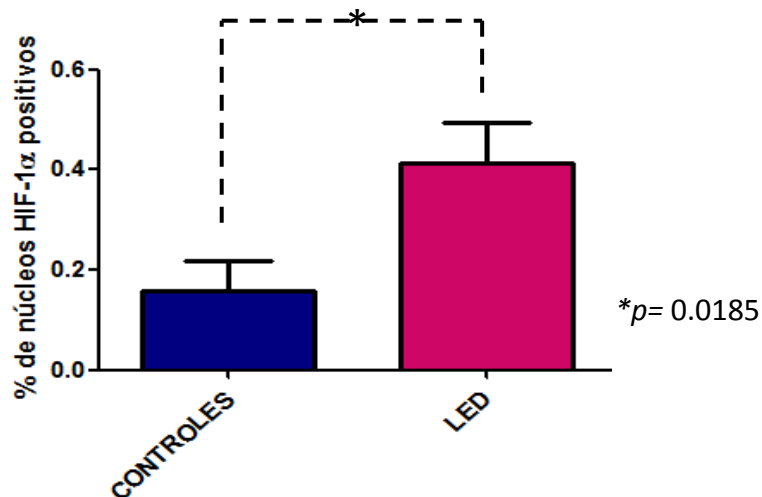


En el análisis cuantitativo de los píxeles positivos calculado en base a la intensidad de coloración positiva café presente en las biopsias de pacientes con LED y controles normales no se observa una diferencia significativa entre los dos grupos (Gráfica 5).



Gráfica 5. La expresión de HIF-1 α en pacientes con LED y controles normales no es diferente. Se graficó la cantidad de píxeles positivos para pacientes con LED (barra rosa) y controles (barra verde) en un área determinada de $3000 \pm 500 \mu\text{m}^2$ en el microarreglo de tejido.

El análisis cuantitativo de la expresión de HIF-1 α dio como resultado una mayor expresión del marcador HIF-1 α en pacientes con LED en comparación con los controles de piel sana (Gráfica 6).



Gráfica 6. El porcentaje de núcleos positivos para HIF-1 α en pacientes con LED es mayor en comparación con los controles. La gráfica muestra a los pacientes con LED (barra magenta) en comparación con los controles de piel sana (barra azul). El porcentaje de núcleos se determinó mediante la cuantificación de núcleos positivos y núcleos totales de ambos grupos en la misma área determinada para el análisis de píxeles positivos.

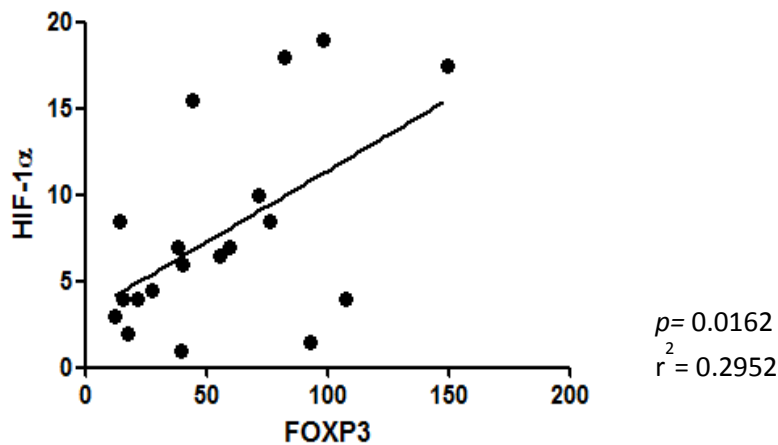
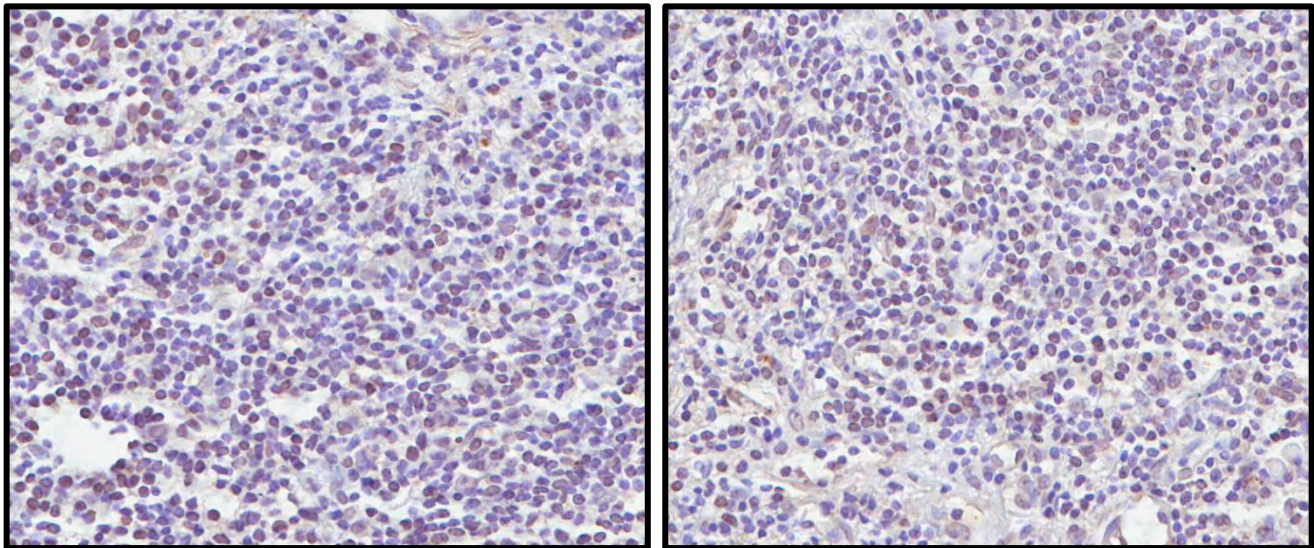


V. CORRELACIONES OBTENIDAS ENTRE HIF-1 α CON FOXP3 Y ROR γ t

Se llevó a cabo un análisis de correlación entre la expresión de HIF-1 α y FOXP3 nuclear para el grupo de pacientes con LED utilizando un análisis de regresión. Los resultados nos muestran que existe una correlación directamente proporcional entre la expresión de HIF-1 α y FOXP3 (Gráfica 7).

HIF- 1 α

FOXP3



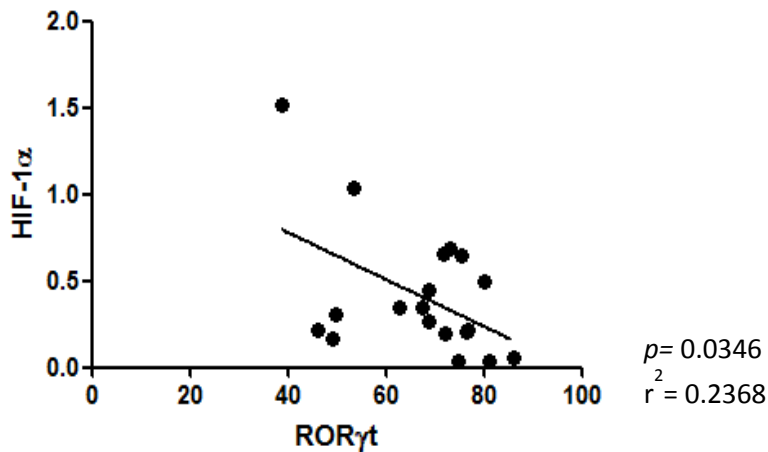
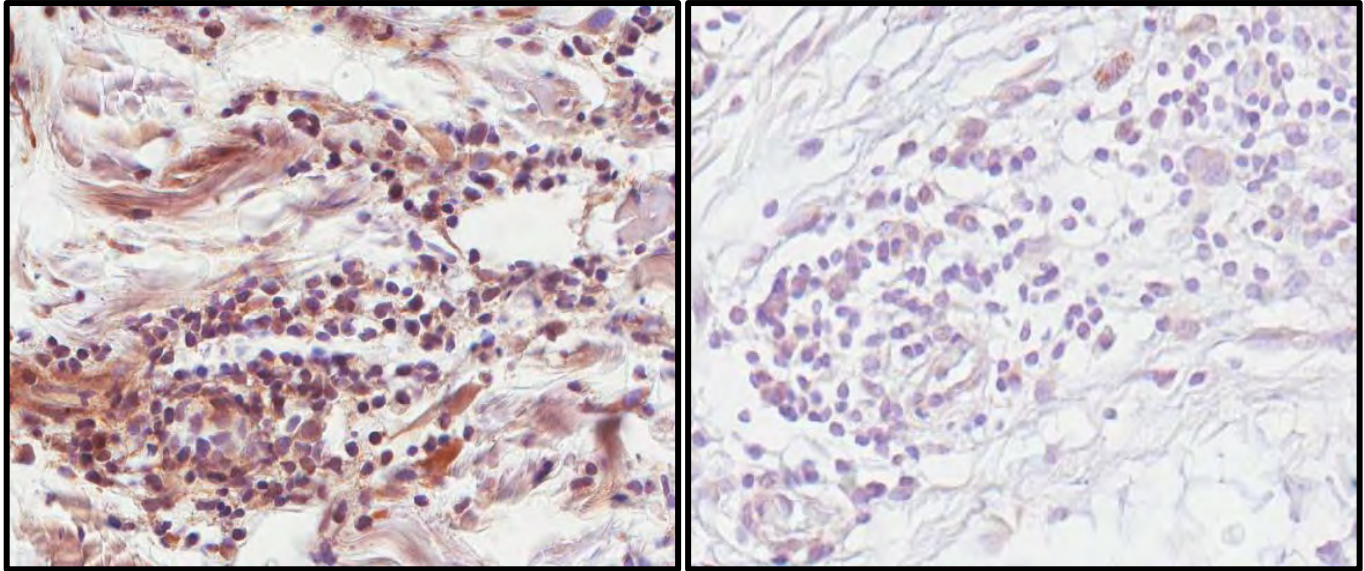
Gráfica 7. Correlación entre la expresión de HIF-1 α y FOXP3. La expresión de estos marcadores medida por la cantidad de núcleos positivos correlaciona positivamente en pacientes con LED. En la parte superior se observan imágenes de biopsias de pacientes con LED para HIF-1 α y para FOXP3. Ambas imágenes tienen un aumento de 20 X.



Al realizar el análisis de correlación entre la expresión de HIF-1 α y ROR γ t nuclear en el grupo de pacientes con LED se encontró que existe una correlación inversamente proporcional entre la expresión de estos marcadores (Gráfica 8).

HIF - 1 α

ROR γ t



Gráfica 8. Correlación entre la expresión de HIF-1 α y ROR γ t. La correlación de estos marcadores esta medida por el porcentaje de núcleos positivos en el grupo de pacientes con LED y es inversamente proporcional. En la parte superior se muestran imágenes de biopsias de pacientes con LED para HIF-1 α y para ROR γ t. Ambas imágenes tienen un aumento de 20X.



DISCUSIÓN

El presente trabajo se enfocó en evaluar la expresión de ROR γ t, FOXP3 y HIF-1 α en infiltrados linfocitarios de lesiones de pacientes con LED, para lo cual se reclutaron 20 pacientes con LED y de ellos se obtuvo una biopsia de la piel lesionada. Nuestros hallazgos indican que existen células que expresan dichas moléculas en los infiltrados celulares antes mencionados.

Como se mencionó anteriormente, los linfocitos T_{reg} son una población celular clave en el control de la autoinmunidad; en contraparte, los linfocitos Th17 se han identificado como una población involucrada en el mantenimiento de la inflamación en distintas enfermedades autoinmunes (Alunno et al., 2012). En LED se conoce que la exposición de la piel y las lesiones a luz UV es considerada como desencadenante para la liberación de citocinas y factores pro-inflamatorios por ejemplo: TNF α , IL-6, los cuales contribuyen a establecer un ambiente inflamatorio en las lesiones cutáneas en conjunto con INF α , el cual también se encuentra en las lesiones cutáneas y es secretado por pCD, mismas que también se encuentran en dichas lesiones. Sin embargo, no se conoce como se encuentran las poblaciones de linfocitos Th17 y T_{reg} en las lesiones cutáneas de esta enfermedad y si el factor de transcripción HIF-1 α , que actúa como punto de control metabólico y regulador de la diferenciación entre estas dos poblaciones celulares pueda favorecer el desarrollo de alguna de estas dos poblaciones lo cual podría traer como consecuencia un desequilibrio Th17/T_{reg}, en esta enfermedad.

Los resultados de este trabajo nos señalan que en las células presentes en el infiltrado celular de la dermis de los pacientes con LED reclutados muestran que existe expresión del factor de transcripción ROR γ t en los infiltrados celulares y que esta expresión es significativamente mayor que la que se observa en la dermis de los individuos control. Se sabe que ROR γ t es un factor transcripcional que se expresa en los linfocitos Th17 (Korn et al., 2009) por lo que estos resultados sugieren que los linfocitos T presentes en las lesiones de los pacientes podrían tener este perfil de diferenciación. La presencia de esta subpoblación celular podría contribuir al ambiente inflamatorio presente en las lesiones de esta enfermedad. Estos resultados estarían de acuerdo con lo reportado para LES, resultados en los que se ha reportado un incremento en los linfocitos con fenotipo Th17 en la circulación. (Bălănescu et al., 2010). Los linfocitos Th17 son importantes en la respuesta a infecciones extracelulares bacterianas de intestino y vías aéreas, sin embargo en diversos trabajos



ha sido reportado que esta sub-población de linfocitos puede tener un papel patológico en diversas enfermedades autoinmunes exacerbando la inflamación característica de dichos padecimientos (Dang et al., 2011). La determinación del factor de transcripción ROR γ t característico de los linfocitos Th17 es el primer acercamiento al estudio de esta población celular en pacientes con LED sin embargo, es esencial determinar además la expresión de IL-17 en los infiltrados celulares así como determinar la expresión tanto de ROR γ t como de IL-17 en los linfocitos T ya que otras poblaciones celulares pueden también expresar tanto el factor de transcripción como la citocina.

En relación a los linfocitos T_{reg}, FOXP3 ha sido definido por diversos autores como el gen maestro controlador del desarrollo y función de los linfocitos reguladores (González Parias et al., 2010) por lo que se consideró como marcador de esta población celular. Además, la expresión de FOXP3 ha sido descrita como marcador específico para los linfocitos T_{reg} (Franz et al., 2007).

Los linfocitos T_{reg} muestran actividad supresora hacia linfocitos T autorreactivos evitando, la aparición de una respuesta autoinmune. En LES se han encontrado T_{reg} deficientes en función y números reducidos de T_{reg} tanto en modelos murinos como en pacientes con LES comparados con controles sanos (Bonelli et al., 2008).

Nuestros resultados indican que existe expresión de FOXP3 en los infiltrados celulares de los pacientes con LED, sin embargo, el porcentaje de núcleos FOXP3 positivos en pacientes es significativamente menor a la observada en los controles. Así mismo, la intensidad de la expresión del marcador (cuantificada como píxeles positivos) es similar en los controles y en los pacientes con LED. La presencia disminuida de linfocitos T_{reg} coincide con lo reportado en la literatura para pacientes con LES puesto que grupos de trabajo han reportado una disminución en el número de linfocitos T_{reg} en circulación (Bonelli et al., 2008; Valencia et al., 2007) de manera que se sugiere que los linfocitos T_{reg} no pueden controlar eficazmente a los linfocitos Th17, aumentando así la expansión y función de éstos últimos.

En conjunto, el análisis de la expresión de los marcadores anteriores nos sugiere que el equilibrio Th17/ T_{reg} podría estar alterado en las lesiones cutáneas de pacientes con LED comparado con el de individuos control, el balance Th17/T_{reg} se encuentra favorecido hacia los linfocitos Th17.



Como se mencionó HIF-1 α es el regulador metabólico que media el cambio de fosforilación oxidativa a glicólisis anaeróbica en respuesta a hipoxia (Semenza, 2007). Sin embargo recientemente se describió que puede participar como un factor esencial para la diferenciación entre dos linajes celulares estrechamente relacionados: Th17 y T_{reg} (Shi et al., 2011).

El grupo de trabajo de Dang propone que el factor HIF-1 α participa en el control del balance TH17/T_{reg}, degradando al factor de transcripción FOXP3 e inhibiendo la diferenciación hacia linfocitos T_{reg} o favoreciendo el desarrollo de linfocitos Th17 a través de la activación directa de la transcripción de ROR γ t mediante la formación del complejo terciario con ROR γ t y p300 con el reclutamiento del promotor de IL-17 resultando linfocitos Th17 (Dang et al., 2011). El grupo de trabajo de Shi también proponen a HIF-1 α como un factor esencial en la diferenciación Th17/ T_{reg} al observar en sus experimentos moléculas relacionadas con la glicólisis en linfocitos Th17. También utilizan moléculas para bloquear la glicolisis observando una diferenciación menor hacia linfocitos Th17 y mayor hacia linfocitos T_{reg} (Shi et al., 2011).

En contraparte en un estudio anterior, el grupo de trabajo de Ben – Shoshan indica que al silenciar la expresión de HIF-1 α disminuye el efecto sobre FOXP3. También observan que los linfocitos T_{reg} de ratón que se someten a hipoxia tienen mayor capacidad supresora que los que se encuentran en normoxia (Ben – Shoshan et al., 2008). Clambey et al., señalan que particularmente durante el ambiente inflamatorio hipóxico, HIF-1 α puede activar múltiples mecanismos antiinflamatorios. Además, este grupo de trabajo menciona que el promotor de FOXP3 posee sitios de unión a HIF-1 α y que en condiciones de hipoxia promueve la abundancia y función de los linfocitos T_{reg} (Clambey et al., 2012). Sin embargo no se ha evaluado el papel de HIF-1 α en una patología como LED.

Nuestros resultados muestran que existe expresión de HIF-1 α en el infiltrado celular de las biopsias de pacientes con LED y que esta expresión es significativamente mayor en los pacientes que en los controles. Esta expresión puede relacionarse a que en las zonas de infiltrado celular y ambientes inflamatorios existe un ambiente relativamente hipóxico (Dang et al., 2011), hecho que puede activar la respuesta de HIF-1 α y explicar su expresión incrementada en los infiltrados celulares presentes en los pacientes con LED. Por otro lado, al activarse los linfocitos vía TCR se favorece la transcripción de HIF-1 α . Esta transcripción se observó que es esencial para la diferenciación hacia Th17 (Dang et al., 2011; Shi et al., 2011).



A pesar de que claramente observamos la expresión de este factor de transcripción en los infiltrados celulares en las lesiones de los pacientes con LED es importante evaluar su expresión en los linfocitos T CD4⁺ para poder determinar su posible participación en la regulación de las poblaciones Th17/T_{reg}. Sin embargo como un primer acercamiento para determinar si la expresión de HIF-1 α tenía alguna relación con la expresión de los otros factores de transcripción evaluados en este trabajo, se realizaron correlaciones entre los datos analizados. Al analizar el porcentaje de núcleos positivos para HIF-1 α y ROR γ t, la gráfica 8 evidencia que existe una correlación negativa entre la expresión de dichos marcadores ($r^2= 0.2368$, $p= 0.0346$).

Dicha correlación obtenida nos sugiere que en los pacientes con LED HIF-1 α no parece regular positivamente a ROR γ t como sucede en los trabajos realizados por nuestro grupo en pacientes con LCCT. Estos resultados tampoco son los esperados de acuerdo a lo publicado por el grupo de Dang y por el grupo de Shi.

De igual forma se realizó un análisis de correlación entre el número de núcleos positivos para HIF-1 α y FOXP3; la gráfica 7 nos muestra que existe una correlación directamente proporcional entre ambos marcadores ($r^2=0.2952$, $p=0.016$). De nuevo los resultados no coinciden con lo reportado por el grupo de Dang et. al., sin embargo en un artículo del grupo de trabajo de Clambey plantea que HIF-1 α puede promover la transcripción de FOXP3, hecho que podría suceder en las lesiones de los pacientes con LED.

El grupo de Clambey analizó las consecuencias transcripcionales en un ambiente hipóxico (1% oxígeno) con un amplio panel de factores de diferenciación de linfocitos T. Sus estudios revelaron una inducción selectiva y robusta de FOXP3, debido a la activación de HIF-1 α , en condiciones de hipoxia inflamatoria mediante la inducción coordinada de la ruta de adenosina extracelular, ruta que puede promover la diferenciación hacia T_{reg}. Además también señalaron que el promotor de FOXP3 posee sitios de unión a HIF-1 α lo que promueve su transcripción y aumenta así la diferenciación hacia T_{reg} (Clambey et al., 2012). Postura que también coincide con una publicación anterior realizada por el grupo de trabajo de Ben - Shoshan et. al. (Ben – Shoshan et al., 2008)

Sin embargo, es importante señalar que sus experimentos fueron realizados in vitro en condiciones experimentales controladas lo cual puede ser distinto a lo que sucede en la piel con una patología como el LED en la que pueden influir otros factores como las citocinas presentes en el tejido.



Nuestros resultados obtenidos del análisis de correlación entre la expresión de HIF-1 α vs FOXP3 en pacientes con LED coinciden con lo publicado por estos grupos de trabajo, sugiriendo que en una patología inflamatoria cutánea como el LED podrían existir condiciones de hipoxia inflamatoria en las lesiones de los pacientes, probablemente debido a la gran cantidad de células presentes en ellas. Esta situación podría favorecer la expresión de HIF-1 α y este a su vez unirse al promotor de FOXP3 promoviendo así un aumento de linfocitos T_{reg}, explicando así la correlación positiva entre la expresión de estos dos marcadores. Nuestros resultados sugieren que en los pacientes con LED la expresión de HIF-1 α podría ser clave para incrementar los niveles de FOXP3 y restablecer el balance Th17/T_{reg}. Aunque las correlaciones obtenidas son significativas, éstas son bajas, lo cual podría solucionarse al elevar la cantidad de los pacientes con LED y de muestras control.

El LED es una enfermedad autoinmune inflamatoria cutánea que dentro de la clasificación de LEC, se considera la tercera causa más común de incapacidad en el trabajo debido a enfermedad dermatológica, después de la dermatitis atópica y la dermatitis por contacto. Es por ello que es de suma importancia el estudio de la participación de los linfocitos Th17 y T_{reg} en patogenia de esta enfermedad para en un futuro encontrar nuevos blancos terapéuticos así como un diagnóstico oportuno y un tratamiento adecuado para mejorar la calidad de vida del paciente con LED.

Nuestros resultados sugieren que existe un aumento de linfocitos Th17 en las lesiones de pacientes con LED así como una disminución en linfocitos T_{reg}, lo cual coincide con lo reportado para otras enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple o el mismo LES, así como para otras enfermedades cutáneas como psoriasis o dermatitis atópica. Esto además de ampliar nuestro conocimiento sobre la enfermedad, abre un campo de opciones para terapias biológicas que tengan como blanco controlar la producción de IL-17 como se ha logrado en psoriasis. Por otro lado, al encontrar expresión de HIF-1 α correlacionada con FOXP3 se revela un papel para este sensor metabólico en la respuesta inmune de esta enfermedad. Y ya que existen fármacos que nos permiten modular la expresión de HIF-1 α así como su traslocación al núcleo, es posible especular que estos se puedan usar en enfermedades autoinmunes para restablecer el equilibrio Th17/T_{reg}.



CONCLUSIONES

- Se encontró un incremento en la expresión de ROR γ t en la dermis de lesiones de pacientes con LED, lo cual podría favorecer la diferenciación Th17 en los pacientes con LED.
- La disminución en la expresión de FOXP3 nuclear en las lesiones de pacientes con LED podría estar relacionada a una reducción en la frecuencia de linfocitos T_{reg} en los pacientes con LED.
- Estos resultados sugieren que el balance Th17/T_{reg} pudiera estar alterado en los pacientes con LED.
- Se encontró un incremento en la expresión de HIF-1 α en el infiltrado celular de pacientes con LED.
- Las correlaciones observadas sugieren que HIF-1 α parece regular positivamente a FOXP3 en los pacientes con LED, por lo que se sugiere que la expresión de HIF-1 α podría ser clave para incrementar los niveles de FOXP3 y restablecer el balance Th17/T_{reg}.



BIBLIOGRAFÍA

- Abdulahad, W, Boots A, Kallenberg, C. (2011). FoxP3+ CD4+ T cells in systemic autoimmune diseases: the delicate balance between true regulatory T cells and effector Th-17 cells. *Rheumatology (Oxford, England)*, 50(4), 646–56.
- Alunno, A., Bartoloni, E., Bistoni, O., Nocentini, G., Ronchetti, S., Caterbi, S., Valentini, V., et al. (2012). Balance between regulatory T and Th17 cells in systemic lupus erythematosus: the old and the new. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 1 – 5.
- Angotti, C. (2003). Immunology of cutaneous lupus erythematosus. *Clinics in dermatology*, 22(2), 105–12.
- Aquino A, González G. (2010) El papel del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en la fibrosis pulmonar idiopática. *Neumol Cir Torax* 69(3),170-177
- Bălănescu, P., Bălănescu, E., Tănăsescu, C., Nicolau, A., Tănăsescu, R., Grancea, C., Vagu, C., et al. (2010). T helper 17 cell population in lupus erythematosus. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de médecine interne*, 48(3), 255–9.
- Ben-Shoshan, J., Maysel-Auslender, S., Mor, A., Keren, G., & George, J. (2008). Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha. *European journal of immunology*, 38(9), 2412–2418.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom T B, Oukka M, Weiner H L & Kuchroo V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235 – 238.
- Bonelli M, Savitskaya A, Von Dalwigk K, Steiner C, Aletaha D, Smolen J, Scheinecker C. (2008) Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) *International Immunology*, 20(7), 861–868.
- Bonelli M, Savitskaya A, Steiner C, Rath E, Smolen J, Scheinecker C. (2009) Phenotypic and Functional Analysis of CD4+ CD25- Foxp3+ T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 182 1689-1695.
- Buckner J. (2010) Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.*; 10(12) 849–859.
- Callen, J. P. (2006). Cutaneous lupus erythematosus: a personal approach to management. *The Australasian journal of dermatology*, 47(1), 13–27.
- Campbell D, Koch M. (2011) Phenotypic and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 11(2) 119–130.



- Castrillón L, Palma A, Padilla C. (2008) La función inmunológica de la piel. *Dermatología Rev Mex* 52(5), 211 – 224.
- Clambey E, McNamee E, Westrich J, Glover L, Campbell E, Jedlicka P, de Zoeten, E, et al. (2012). Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(41), 2784–93.
- Cojocaru M, Cojocaru I, Silosi I, Vrabie C (2011) Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica*. 6, 330 – 336.
- Crowson N, Magro C. (2001). The cutaneous pathology of lupus erythematosus: a review. *Journal of cutaneous pathology*, 28(1), 1–23.
- Curotto de Lafaille M, Lafaille, J. J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 30(5), 626–35.
- Dang, E. V., Barbi, J., Yang, H.-Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., et al. (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, 146(5), 772–84. doi:10.1016/j.cell.2011.07.033
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *The Journal of experimental medicine*, 193(11), 1303–10.
- Durant L, Watford W, Ramos H, Laurence A, Vahedi G, Wei L, Takahashi H, Sun H, Kanno Y, Powrie F, O'Shea J. (2010) Diverse Targets of the Transcription Factor STAT3 Contribute to T Cell Pathogenicity and Homeostasis. *Immunity*
- Fehérvári Z, Sakaguchi S. (2004) Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Current Opinion in Immunology* 16(2), 203–208.
- Franz B, Fritzsching B, Riehl, Oberle, Klemke C, Sykora J, Quick S, et al. (2007). Low number of regulatory T cells in skin lesions of patients with cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 56(6), 1910–20.
- González Parias J, Duque Giraldo, V, Velásquez-Lopera, M. (2010). FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología*, 29(2), 74–84.
- Green D, Droin N, Pinkosk M. (2003) Activation-induced cell death in T cells. *Immunological Reviews* 193(1), 70–81.
- Grönhagen C, Fored C, Granath F, Nyberg, F. (2011). Cutaneous lupus erythematosus and the association with systemic lupus erythematosus: a population-based cohort of 1088 patients in Sweden. *The British journal of dermatology*, 164(6), 1335–41.



- Höpfel G, Ogunshola O, Gassmann M. (2003). Hypoxia and high altitude. The molecular response. *Adv Exp Med Biol.* 543, 89-115.
- Horwitz, D. (2008). Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Arthritis research & therapy*, 10(6), 227.
- Ivanov I, McKenzie S, Zhou L, Tadokoro C, Lepelley A, Laflamme J, Cua D, et al. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121–33.
- Jessop S, Whitelaw D (2003) *Cutaneous lupus erythematosus*. En: Williams H, Bigby M, Diepgen T, Herxheimer A, Naldi L, Rzany B. Evidenced – based dermatology. London: BMJ Books. 605 – 619.
- Johnson-Huang L, Scott N, Krueger J, Lowes M. (2009) “Cytokine – Producing Dendritic Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Skin Diseases”. *J Clin Immunol.* 29, 247 – 256.
- Kind P, Lipsky P, Sontheimer R. (1986) Circulating T – and B – Cell Abnormalities in Cutaneous Lupus Erythematosus *The Journal of Investigative Dermatology.* 86(3) 235 – 239.
- Kind T, Goldsby R, Osborne B (2007) *Inmunología de Kuby*. México: Mc Graw – Hill Interamericana.
- Kleczynska W, Jakiela B, Plutecka H, Milewski M, Sanak M, Musial J. (2011). Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 49(4), 646–53.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo, V. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*, 27, 485–517.
- Kwan B, Tam L, Lai K, Lai F, Li E, Wang G, Chow, et al. (2009). The gene expression of type 17 T-helper cell-related cytokines in the urinary sediment of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford, England)*, 48(12), 1491–7.
- La Cava, a. (2009). Lupus and T cells. *Lupus*, 18(3), 196–201.
- Liu Y, Zhu T, Cai G, Qin Y, Wang W, Tang G, Zhao D, et al. (2011). Elevated circulating CD4+ ICOS+ Foxp3+ T cells contribute to overproduction of IL-10 and are correlated with disease severity in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 20(6), 620–7.
- Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Nochy D, et al. (2005). Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(12), 8392–400.
- Méndez E. (2009) *Caracterización fenotípica y funcional de células dendríticas en lupus discoide*. (Tesis de maestría) Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México.



- Modlin R, Kim J, Maurer D, Bangert C, Stingl G. (2003) Inmunidad innata y adaptativa de la piel. En: Wolff K, *et al.* Fitzpatrick Dermatología en Medicina General. 7 edición. Buenos Aires: Médica Panamericana. 95 – 105.
- Murphy C, Langrish, C, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein R, Sedgwick, J, et al. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*, 198(12), 1951–7.
- Myrna D, Acar, R, Themis D, Oliveros G, Garibay, A. (2006) Lupus eritematoso discoide. Presentación de un caso. *Revista del Centro Dermatológico Pascua* 15, 9–15.
- Nestle F, Di Meglio, P, Qin J, Nickoloff, B. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 9(10), 679–91.
- Norihiko W, Yi – Hong W, Heung KL, Tomoki I, Yui – His W, Wie C, Yong –Jun L. (2005) Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181 – 1185.
- Petri M, Magder L. (2004). Classification criteria for systemic lupus erythematosus: a review. *Lupus*, 13(11), 829–37.
- Robert C, Kupper T. (1999) “Inflammatory Skin Diseases, T Cells, and Immune Surveillance” *N Engl J Med*. 341, 1817 – 1828
- Rodríguez M, Gutiérrez T, Ramos A. (2006) Lupus eritematoso discoide. Presentación de un caso. *Rev Cent Dermatol Pascua* 15(1) 9 – 15.
- Rodríguez J, Gil R. (2000) Estructura de la piel. En: Iglesias L, Guerra A, Ortiz P. “Tratado de dermatología” España: Medicina, 1 -13.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), 775–87.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino C, Hafler DA. (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews* 10, 490 – 500.
- Salomón M, Samalvides F, Gutierrez C. (2009). Manifestaciones histopatológicas del lupus eritematoso cutáneo en pacientes del Servicio de Dermatología del Hospital Nacional Cayetano Heredia , 2003-2008, 20(2), 64–70.
- Schwartz R. (2002) T cell anergy. *Annual Review of Immunology*, 21, 305-334



- Sharma V, Dixit D, Koul N, Mehta VS, Sen E. (2011) Ras regulates interleukin-1 β -induced HIF-1 α transcriptional activity in glioblastoma. *J Mol Med (Berl)*. 89(2), 123-36.
- Semenza, G. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2007(407)
- Shi L, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green D, Chi H. (2011). HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *The Journal of experimental medicine*, 208(7), 1367–76.
- Solomon G, Magro M. (2008). Foxp3 expression in cutaneous T-cell lymphocytic infiltrates. *Journal of cutaneous pathology*, 35(11), 1032–9.
- Stasinopoulos I, O'Brien DR, Bhujwala ZM. (2009) Inflammation, but not hypoxia, mediated HIF-1 α activation depends on COX-2. *Cancer Biol Ther*, 8(1), 31-5.
- Su K, Pisetsky D. (2009). The role of extracellular DNA in autoimmunity in SLE. *Scandinavian journal of immunology*, 70(3), 175–83.
- Suen, Li H, Jong Y, Chiang B, Yen J. (2009). Altered homeostasis of CD4(+) FoxP3(+) regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology*, 127(2), 196–205.
- Tesmer L, Lundy S, Sarkar S, Fox D. (2008) Th17 cells in human disease. *Immunol Rev.*223 87–113.
- Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Freitas J, Marques Gomes M, Filipe P. (2012). Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Autoimmune diseases*, 2012.
- Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky P. (2007) Deficient CD4CD25^{high} T Regulatory Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* 178 2579 – 2588.
- Vera-Recabarren M, García-Carrasco M, Ramos-Casals M, Herrero C. (2010a). Comparative analysis of subacute cutaneous lupus erythematosus and chronic cutaneous lupus erythematosus: clinical and immunological study of 270 patients. *The British journal of dermatology*, 162(1), 91–101.
- Vera-Recabarren M, García-Carrasco M, Ramos-Casals, M, Herrero C. (2010b). Cutaneous lupus erythematosus: clinical and immunological study of 308 patients stratified by gender. *Clinical and experimental dermatology*, 35(7), 729–35.
- Waite J, Skokos D. (2012). Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *International journal of inflammation*.
- Wenzel J, Zahn S, Tüting T. (2010). Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus: common and different features in distinct subsets. *Lupus*, 19(9), 1020–8.



- Xie, Y. (2011). Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in discoid lupus erythematosus. *BioScience Trends*, 5(2), 83–88.
- Yang J, Chu Y, Yang X, Gao D, Zhu L, Yang X, Wan L & Li M. (2009) Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 60, 1472–1483.
- Yang J, Yang X, Zou H, Chu Y, Li M. (2011). Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T cells as a treatment for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford, England)*, 50(8), 1366–72.
- Yang X, Panopoulos A, Nurieva R, Chang S, Wang D, Watowich S, Dong C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of biological chemistry*, 282(13), 9358–63.
- Zandman-Goddard G, Solomon M, Rosman Z, Peeva E, Shoenfeld Y. (2012). Environment and lupus-related diseases. *Lupus*, 21(3), 241–50.
- Zarek P, Huang Ching-Tai, Lutz E, Kowalski J, Horton M, Linden J, Drake C, Powell J. (2008) A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*, 111(1), 251–259.