



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS
INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS EN
ENFERMEDADES AMPOLLOSAS.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

MARÍA DE LOS ANGELES IBARRA MENESES



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. DIANA ELODIA AGUILAR LEÓN

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Ibarra
Meneses
María de los Angeles
54 28 85 24
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308265718
2. Datos del tutor
Dra.
Diana Elodia
Aguilar León
3. Datos del sinodal 1
Dra.
María Genoveva
González
Morán
4. Datos del sinodal 2
Química
Viviana
Escobar
Sánchez
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe
6. Datos del sinodal 4
Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García
7. Datos del trabajo escrito
Evaluación de la expresión de Citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en enfermedades ampollasas
66 p.
2015

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) en el departamento de Patología Experimental, bajo la asesoría de la Dra. Diana Elodia Aguilar León.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Diana Aguilar León por su asesoría y apoyo durante cada una de las etapas del proyecto, por ser guía en mi formación científica y permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A mis compañeros de laboratorio y tesis: Laura García y Humberto Martínez que me brindaron su apoyo desinteresado, por ayudarme en la realización de los experimentos y por hacer un ambiente tan ameno durante las horas arduas de trabajo.

A mis sinodales por aceptar ser parte de mi jurado, dedicarme tiempo en la revisión del escrito y por cada una de sus correcciones, las cuales fueron de gran ayuda.

A la UNAM y en especial a la Facultad de Ciencias por permitirme estudiar en sus instalaciones y formar parte de esa comunidad científica. A cada uno de mis profesores por motivarme e inculcarme los valores y conocimientos que hoy en día me han servido para seguir el camino siendo una mejor persona.

Dedicatorias

Esta tesis va dedicada a mis padres quienes son parte fundamental de mi vida, gracias a su apoyo y esfuerzo he logrado llegar a esta etapa, cada uno de sus consejos y regaños me han servido para crecer personal y profesionalmente y el logro no es solamente mío sino de ellos también.

A mis hermanos: Alejandro y Martín que aunque no lo crean he aprendido cosas muy valiosas de cada uno.

Con cariño, respeto y admiración a mis abuelos, tíos y primos que de alguna forma han contribuido en la orientación de mi vida personal y profesional.

A cada uno de mis amigos que siempre han estado, gracias por apoyarme y entenderme, por hacerme la vida tan divertida, por creer en mí, por permitirme ser parte de su vida y demostrarme lo mucho que me quieren con cada uno de sus detalles.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Sistema Inmunológico	3
Autoinmunidad	5
Estructura de la piel	6
Lupus Eritematoso Sistémico (LES)	7
Lupus Eritematoso Cutáneo (LEC)	8
Lupus EritematodoDiscoide (LED)	10
Pustulosis Amicrobiana de las Flexuras (PAF)	10
Pustulosis asociada a otra enfermedad autoinmune (APAD)	11
Pénfigo	11
Psoriasis	13
Causas de las lesiones cutáneas	13
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
PCR punto final	14
PCR tiempo real (qPCR)	16
ANTECEDENTES	19
Factores que influyen en el desarrollo de enfermedades autoinmunes	19
Citocinas como marcadores para enfermedades autoinmunes	21
Interferón	22
Interleucinas	23
Factor de Necrosis Tumoral (TNF)	25
Quimiocinas	26
JUSTIFICACIÓN	27

OBJETIVOS	27
MÉTODOS	28
Selección de muestras.....	28
Extracción de RNA.....	28
Cuantificación de RNA.....	29
Síntesis de cDNA.....	29
Diseño de los primers	29
PCR punto final para amplificación del gen constitutivo.....	31
Electroforesis de DNA en gel de agarosa.....	32
PCR punto final para verificar que los primer reconocen la secuencia blanco.....	32
PCR tiempo real.....	33
Curva estándar	33
Mezcla de reacción para el qPCR	34
Análisis estadístico.....	35
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	48
REFERENCIAS	50
ANEXOS	56
Electroforesis.....	56
Gel de agarosa 1.8%.....	56
Buffer de corrida (TAE 10x)	56
Buffer de carga 6x.....	56
Tinción para neutrófilos.....	57
Inmunohitoquímica (con anti-mieloperoxidasa)	57

ABREVIATURAS

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

APAD: *Amicrobial Pustulosis associated with Autoimmune Disease* (pustulosis amicrobiana asociada con enfermedades autoinmunes)

CD: *Cluster of Differentiation* (grupo de diferenciación)

CXCL9: quimiocina motivo cxc ligando 9

DC: Células Dendríticas

Dgs: Desmogleínas

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatados

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FOXP3: factor de transcripción FOXP3

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

IFN: Interferón

LCA: Lupus Cutáneo agudo

LCC: Lupus Cutáneo Crónico

LCI: Lupus Cutáneo Intermittente

LCS: Lupus Cutáneo Subagudo

LEC: Lupus Eritematoso Cutáneo

LED: Lupus Eritematosos Discoide

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

mM: milimolar

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

NK: *Natural Killer Cell* (células asesinas naturales)

pb: pares de bases

PBMCs: células mononucleares de la sangre periférica

PAF: Pustulosis Amicrobiana de las Flexuras

PCR: *Polymerase Chain* Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

pDC: células dendríticas plasmáticas

PF: Pénfigo Foliáceo

PV: Pénfigo Vulgar

RNA: Ácido Ribonucleico

TAE: Amortiguador Tris, Acetato y EDTA

Tc: Linfocitos T citotóxicos

TGF: Factor de Crecimiento Tumoral

Th: Linfocitos T cooperadores

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

Treg: Linfocitos T reguladores

RESUMEN

Las citocinas son proteínas reguladoras producidas por los linfocitos y macrófagos que median el crecimiento celular, la migración, la inmunidad, la diferenciación, la inflamación y la reparación; dado que regulan todos estos procesos celulares deben ser sintetizadas de forma transitoria y estrictamente regulada. Es por ello que el balance entre las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias es determinante para el desarrollo, el grado, extensión y evaluación del proceso de algunas patologías.

El presente trabajo fue realizado con el objetivo de evaluar la expresión de citocinas inflamatorias mediante qPCR. Las citocinas analizadas fueron: IL-17, TNF- α , IL-18, IL-23 e IFN- α , la quimiocina CXCL9 y el factor de transcripción FOXP3 en bloques de piel embebidos en parafina de pacientes con pustulosis amicrobiana y dicha expresión se comparó con muestras de pacientes con enfermedades asociadas a pustulosis amicrobiana, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso discoide y pénfigo. La técnica de qPCR resultó ser una buena herramienta para este tipo de análisis y podría sumarse a los exámenes de laboratorio e histopatológicos que se realizan actualmente en nuestro país con respecto a las enfermedades estudiadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos concluimos que la técnica de qPCR es una herramienta útil para evaluar la expresión de citocinas inflamatorias en pacientes con pustulosis amicrobiana, observando que estos pacientes presentan una respuesta inflamatoria Th17; mientras que las otras enfermedades muestran una respuesta inflamatoria Th1.

En enfermedades órgano específico como LED y APAD se ve elevada la expresión de IL-18 y TNF- α , que permiten la síntesis de otras citocinas para reclutar a más células en el sitio de inflamación; mientras que en las enfermedades sistémicas como es el caso del LES hay una expresión elevada de

IFN- α con respecto a las demás citocinas, debido a que interfiere permite el reclutamiento de otras células para la producción de citocinas en el sitio de inflamación.

Por lo tanto la cuantificación de la expresión de citocinas en combinación con las técnicas de diagnóstico que se realizan actualmente en nuestro país, serían útiles marcadores para la caracterización de las enfermedades ampollasas.

INTRODUCCIÓN

Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico de los humanos está encargado de combatir los agentes patogénicos capaces de invadir y causar daños al organismo, por lo tanto este sistema se enfrenta a una gran variedad de agentes y para ello ha desarrollado múltiples estrategias. El sistema inmune se compone de células especializadas y moléculas solubles. (Kindt, 2007; Roitt, 2008)

Los leucocitos son una población celular heterogénea que juega diversos papeles en la eliminación de agentes patógenos. En general son clasificados en granulocitos y células mononucleares. Los granulocitos son nombrados así debido a la presencia de gránulos en su citoplasma, dentro de este grupo se encuentran los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos; mientras que entre las células mononucleares se ubican los monocitos y los linfocitos. (Davies, 2001)

Los linfocitos son las células centrales de la inmunidad adaptativa; pueden subdividirse en tres poblaciones:

1. Células B
2. Células T
3. Células asesinas naturales (NK)

Los linfocitos B y T que no han interactuado con algún antígeno se denominan vírgenes. Una vez que hay interacción de los linfocitos con algún antígeno se induce la proliferación de estas células y su diferenciación en células efectoras o bien en células de memoria. (Kindt, 2007)

Las células plasmáticas son las células efectoras que secretan anticuerpos del linaje de células B, mientras que las células efectoras de células T incluyen la célula T colaboradora o cooperadora (célula T_H) que secretan citocinas y células maduras activadas por antígeno del linaje de la célula T citotóxica (célula T_C) conocidas como linfocitos T citotóxicos. (Kindt, 2007) Los linfocitos T_H que inducen

una respuesta inmune celular se denominan Th1 mientras que aquellos que favorecen la respuesta humoral son Th2. (Urra, 2012)

Dentro del linaje de las células T se ha caracterizado una tercera subpoblación, las células T reguladoras (T_{reg}), que tienen como función la supresión de linfocitos T autorreactivos para evitar la manifestación de una respuesta autoinmune. Se caracterizan por la expresión de CD25 y del factor de transcripción FOXP3. (Alunno, 2012; Ziegler, 2009)

Adicional a los componentes celulares mencionados anteriormente, el sistema inmune cuenta con moléculas solubles que forman parte de la respuesta humoral. Esta respuesta es inducida mediante señales químicas, que van dirigidas hacia los linfocitos T, a las células dendríticas (DC), a los macrófagos, favoreciendo la liberación de productos llamados citocinas. (Davies, 2001)

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana así como funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis y generación de inmunoglobulinas. Son producto de diferentes tipos celulares principalmente del sistema inmune, entre estos se encuentran los linfocitos y los macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y adipocitos. Se unen a sus receptores específicos en la membrana de las células blanco e inician vías de transducción de señales que al final alteran la expresión génica de las células blanco, regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune al estimular o inhibir la activación, inflamación, respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis y otros procesos biológicos. (Lourenco, 2013; Kindt, 2007; Urra, 2012)

Las citocinas suelen actuar localmente en forma autócrina (sobre la célula que las sintetizó) y parácrina (sobre cualquier otro tipo celular). Cada citocina es producto de una sub-población celular en respuesta a diversos estímulos, induciendo la activación de una cascada de señales que tienen efectos agonistas, sinérgicas o

antagonistas, con lo cual se alteran las funciones de la célula blanco. Las actividades pueden ser redundantes, es decir, varias citocinas comparten o inducen los mismos efectos biológicos sobre una célula. (Barros, 2011; Kindt, 2007)

De acuerdo a su actividad, al sitio o fase de la respuesta inmune en la que actúen, se pueden clasificar en: citocinas pro-inflamatorias (Th1) que se encuentran presentes en la respuesta inmune innata, inespecífica o inflamación y favorecen el desarrollo de la inmunidad celular y/o citotóxica; y citocinas anti- inflamatorias (Th2) las cuales cooperan en la inmunidad humoral o en el *switch* de inmunoglobulinas. (Barros, 2011; Kindt, 2007)

Autoinmunidad

En algunos casos se presenta un trastorno denominado autoinmunidad, donde existe una pérdida de los mecanismos que mantienen el equilibrio del sistema inmune humoral y celular en el hospedero. Las causas principales de la autoinmunidad son la predisposición genética y los factores ambientales. (Cañas, 2011; Kindt, 2007)

En la autoinmunidad hay una incapacidad de distinguir lo propio de lo ajeno, lo que da como resultado el ataque de células y órganos propios por varios mecanismos efectores como los auto-anticuerpos y células T autorreactivas. (Cañas, 2011; Kindt, 2007)

Se han descrito varias enfermedades autoinmunes sistémicas (órgano no específico): se presentan cuando los anticuerpos atacan antígenos no específicos en más de un órgano en particular. Existe un grupo de enfermedades que, a pesar de tener algunos antígenos específicos de algunos órganos, no presentan exclusividad para estos por ejemplo polimiositis y el Lupus Eritematoso Sistémico (LES). (Kindt, 2007)

Existen los síndromes locales (órgano específicos): aquellos con carácter endócrino como la diabetes mellitus tipo I, la enfermedad de Addison, la tiroiditis de Hashimoto o bien los padecimientos dermatológicos como el pénfigo vulgar, o de tipo hematológico como la anemia hemolítica autoinmune, en donde se ve involucrado un tejido en particular. (Kindt, 2007)

Estructura de la piel

La resistencia de la piel contra influencias ambientales y su integridad para la protección contra agentes químicos, mecánicos o microbianos radica en dos estructuras que mantienen la adhesión epidérmica: la primera son los desmosomas, que son los encargados de la unión de célula a célula; y la segunda, son los hemidesmosomas, estos implican la unión de las células a la membrana basal. (Navarrete, 2003)

La piel está conformada por tres capas, las cuales son: la epidermis (más externa), la dermis (capa intermedia) y la hipodermis (capa interna). (Figura 1). La epidermis es el tejido más expuesto a las agresiones, debe de estar adaptado para las renovaciones y la reparación, es un epitelio pluriestratificado, cuyas células reciben el nombre de queratinocitos puesto que están especializados a la producción de queratina y filamentos intermedios. (Navarrete, 2003)

Los queratinocitos representan el 95% de las células en la epidermis y se encuentran distribuidos de manera distinta en cada una de las subcapas de la epidermis, que son: células basales, forman la capa más interna, adherida a la membrana basal y son las únicas que se dividen; células espinosas, se disponen en varias capas por encima de las células basales, deben el nombre a que sus numerosos desmosomas, donde se anclan los filamentos de queratina, se observan como espinas; células granulares, sus íntimas uniones determinan la barrera de permeabilidad que impide la pérdida de los fluidos, además son el límite entre la parte activa de la piel y la parte más superficial, formada por células

mueras; y escamas, forman el estrato córneo, se trata de células muertas, reducidas a láminas planas densamente plegadas. (Figura 2) (Navarrete, 2003)

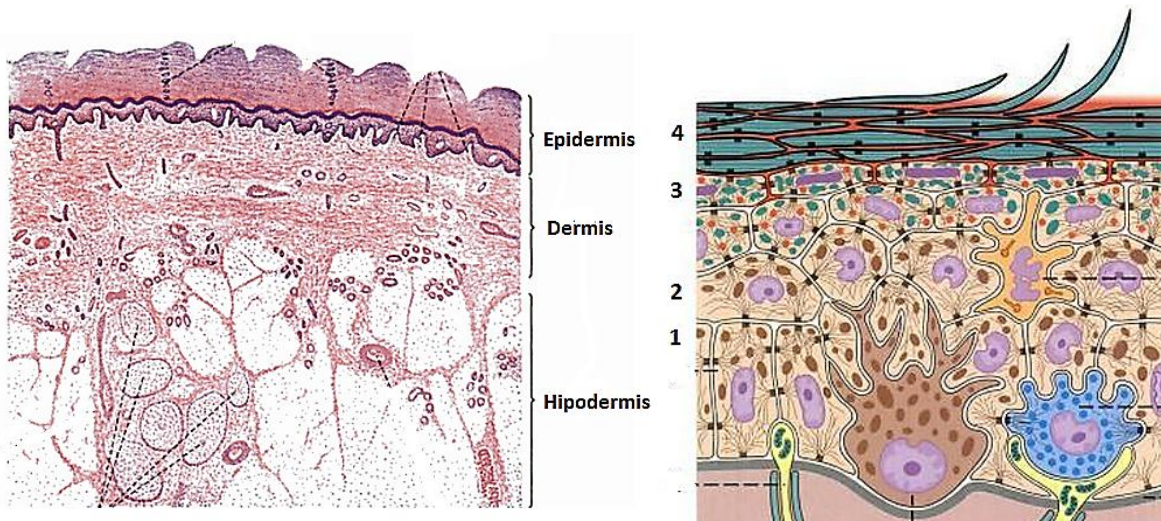


Figura 1. Corte de Piel.

La piel está conformada por tres capas la epidermis (capa externa), la dermis (capa intermedia) y la hipodermis (capa más interna). (Modificada de (Welsch, 2008))

Figura 2. Estratos de la epidermis. 1 Estrato basal; **2** estrato espinoso; **3** estrato granuloso; **4** estrato córneo. (Modificada de (Welsch, 2008))

Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad reumática autoinmune con una amplia variedad de anomalías inmunológicas como hiperreactividad de linfocitos B, auto-anticuerpos, formación de complejos inmunes y vasculitis sistémica. Se presenta con mayor frecuencia en mujeres de 6 a 61 años. (Romero, 2009)

El LES afecta del 5 al 7% de la población humana y a menudo ocasiona estados debilitantes crónicos. Puede afectar cualquier sistema de órganos, incluyendo al cardiovascular, hematológico, tegumentario, locomotor, nervioso, renal y respiratorio; en más de la mitad de los casos es letal. (Sánchez, 2004)

Se caracteriza por la inflamación y daño de tejidos mediado por la unión de anticuerpos a las células del organismo y en especial al depósito de complejos antígeno-anticuerpo; lo anterior casusa la pérdida de la tolerancia a los antígenos

nucleares además de una activación desregulada de linfocitos tanto T como B y posterior activación de las células plasmáticas generando una gran cantidad de anticuerpos autorreactivos, lo que favorece la formación de complejos inmunes. (Lourenco, 2013; Urra, 2012)

El curso de la enfermedad puede ser impredecible, con períodos de crisis alternados con remisión. Puede variar de leve a grave con daño crónico, hasta la enfermedad exclusiva de la piel (Lupus Eritematoso Cutáneo (LEC), o Lupus Eritematosos Discoide (LED)). (Salomón, 2009; Uva, 2012)

Lupus Eritematoso Cutáneo (LEC)

El lupus eritematoso cutáneo presenta varias morfologías es por ello que las manifestaciones se pueden clasificar en específicas y no específicas, dependiendo de la presencia de dermatitis de interfase. Las lesiones específicas pueden ser divididas en cuatro categorías: Lupus Cutáneo Agudo (LCA), Lupus Cutáneo Subagudo (LCS), Lupus Cutáneo Crónico (LCC) y Lupus Cutáneo Intermitente (LCI) (Sontheimer, 1997), basadas en la morfología, duración de las lesiones y la histopatología.

Los hallazgos histológicos en la piel de los pacientes con LEC son: degeneración de los queratinocitos basales de la epidermis, alteraciones en la membrana basal, infiltrado inflamatorio linfocitario perivascular, predominantemente en la unión dermo- epidérmica o en algunos casos perianexial, depósitos dérmicos de mucina y vasculitis leucocitoclástica. (Méndez, 2009)

Las lesiones no específicas pueden ser vistas en otras enfermedades (Tabla 2). (Bielsa, 2010)

Tabla 1. Manifestaciones cutáneas del lupus eritematoso. (Bielsa & Rodríguez, 2010)

Lesiones cutáneas específicas (con dermatitis de la interfase)		Lesiones inespecíficas (sin dermatitis de la interfase)	
Lupus eritematoso cutáneo crónico	Lupus eritematoso discoide localizado	Vasculares	Vasculitis leucocitoclástica
			Vasculopatía
			Livedo reticularis
			Tromboflebitis
	Lupus eritematoso discoide generalizado	Lesiones ampollares	Fenómeno de Raynaud
			Eritemalgia
	Lupus eritematoso hipertrófico o verrucoso	Cutis laxa o anetodermia	LES bulloso
	Paniculitis lúpica		Pénfigo
Lupus eritematoso cutáneo subagudo	Anular	Mucinosis papular de Gold	
	Papuloescamoso		
Lupus eritematoso cutáneo agudo	No determinadas	Pustulosis amicrobiana de las flexuras	

Las lesiones se manifiestan en la cara y zonas expuestas a la luz en forma de placas enrojecidas con descamación y atrofia de la piel, se agrava con la irradiación del sol. Alrededor del 5% de los pacientes con LEC terminan por

presentar manifestaciones en otros órganos, pasando a un diagnóstico de lupus eritematoso sistémico. (Uva, 2012)

El LEC afecta mayoritariamente a personas entre 20 y 40 años, mostrando mayor en mujeres en una proporción 2:1. Estudios realizados en Nueva York, demuestran que el 90% de los pacientes efectivamente son mujeres, en donde las afroamericanas son tres veces más susceptibles a desarrollar la enfermedad que las de raza blanca. (Sánchez, 2004)

Debido a las distintas morfologías clínicas que presenta el LEC, su diagnóstico en muchas ocasiones es complicado de realizar, es por ello que las manifestaciones ampollares en esta enfermedad deben diferenciarse de otras enfermedades como el penfigoide ampollar, epidermólisis bullosa adquirida o con una porfiria cutánea tardía. (Giansante, 2013; Uva, 2012; Vera, 2011)

Lupus Eritematoso Discoide (LED)

El Lupus Eritematoso Discoide es la más común de las enfermedades crónicas en el LEC, las lesiones son en forma de disco, con placas eritematosas de tamaño variable y se presentan áreas de hiperqueratosis foliculares, que son dolorosas si se levantan manualmente. La progresión de la enfermedad puede dar lugar a cambios en la pigmentación, atrofia permanente, cicatrices y alopecias. Las lesiones ocurren típicamente en la cara, cuero cabelludo, orejas, en escote y en las áreas extensoras de los brazos. Las úlceras orales son más frecuentes en los pacientes con LES, sin embargo 24% de los pacientes con LED tienen compromisos mucosos y pueden llegar a presentarse en el paladar, labios o mejillas. (Uva, 2012)

Pustulosis Amicrobiana de las Flexuras (PAF)

La Pustulosis Amicrobiana de las Flexuras (PAF), es otra enfermedad que se ha asociado con lupus, es una entidad poco frecuente, caracterizada por brotes de lesiones pápulo-pustulosas, que afecta predominantemente a pliegues cutáneos, al cuero cabelludo, los conductos auditivos externos y el área genital. Fue descrita

por primera vez en 1991 por Crickx y colaboradores en dos mujeres con lupus, quienes presentaban brotes de pústulas amicrobianas en cuero cabelludo, grandes pliegues y conducto auditivo externo. (Márquez, 2009; Saint- Jean, 2010; Gambichler T. , 2007)

Se han descrito pocos casos que presentan esta enfermedad, sin embargo la mayoría de ellos en mujeres jóvenes (94%) y todos asociados a alguna alteración inmunológica, siendo el lupus eritematoso el más frecuente. (Márquez, 2009)

En esta enfermedad los neutrófilos desarrollan un papel muy importante ya que son los responsables del desencadenamiento de la patología, debido a una disfunción; como sabemos éstos son la primera línea de defensa con la que cuenta el sistema inmunológico, por lo tanto una alteración en su actividad conlleva a la etiopatogenia de esta identidad. (Marzano, 2011)

Pustulosis amicrobiana asociada con enfermedades autoinmunes (APAD)

La pustulosis amicrobiana asociada a una enfermedad autoinmune (APAD), es una enfermedad rara, caracterizada por recaída de erupción pustular, afectando principalmente a los pliegues de la piel. Casi todos los casos descritos hasta la fecha han sido mujeres jóvenes con diferentes enfermedades autoinmunes subyacentes como es el lupus eritematoso, el síndrome de Sjögren y la nefropatía IgA. (Lim, 2012)

Pénfigo

El pénfigo, que es una patología autoinmune poco frecuente, causa grandes úlceras en la piel, existen cuatro tipos pénfigo vulgar (PV), pénfigo foliáceo (PF), pénfigo paraneoplásico, pénfigo IgA. (Valencia, 2011)

La presencia de ampollas en esta enfermedad se debe a acantólisis (separación intercelular) e IgG dirigida a la superficie de los queratinocitos. La piel tiene una apariencia escamosa y con costras, no afecta a mucosas y su blanco principal son los desmosomas. (Valencia, 2011)

Los desmosomas están compuestos por tres familias de proteínas:

1. Las plaquinas: la desmoplaquina, la periplaquina y la enviplaquina.
 2. La familia de las proteínas del armadillo: placofilina y la placoglobina.
 3. La familia de las cadherinas: desmocollinas y desmogleínas (Figura 3)
- (Valencia, 2011)

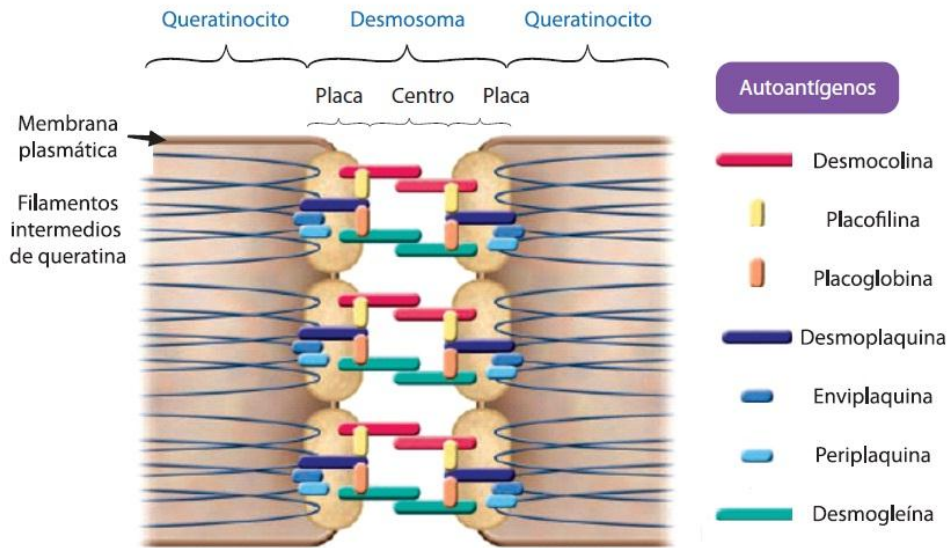


Figura 3. Estructura de los desmosomas.

Las moléculas transmembranales, desmogleínas y desmocollinas, se unen con queratinas del citoesqueleto mediante la interacción con componentes intracelulares de la placa del desmososma como desmoplaquina, placofilina, enviplaquina y periplaquina. (Valencia, 2011)

Existen cuatro tipos de desmogleínas de las cuales la 1 y la 3 se encuentran distribuidas en diferentes proporciones en la piel y mucosas. En el pénfigo foliáceo (PF) se producen anticuerpos dirigidos contra la desmogleína 1 (Dgs-1), el fenómeno de acantólisis representado por ampollas, sólo se observa en la zona subcórnea debido a que la cantidad de Dgs-3 no alcanza a recompensar el bloqueo funcional ocasionado por los anticuerpos; por otro lado, la cantidad de Dgs-3 en las mucosas es suficiente para mantener la adhesión, y esta es la razón por la cual no se presentan las lesiones en las mucosas de los pacientes con PF. (Valencia, 2011)

Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad crónica que ocurre en el 1-3% de la población, se caracteriza por lesiones eritemato-escamosas, se encuentra relacionada con las enfermedades dermatológicas previamente mencionadas principalmente con pustulosis. (Giraldo, 2009; Ríos, 2010)

Afecta a personas de todas las edades, sus manifestaciones clínicas son heterogéneas, desde afectación leve hasta formas muy extendidas. Diversos estudios sugieren que está asociada a un desorden denominado Síndrome Metabólico, que integra a la hipertensión arterial, dislipemia, obesidad, alteraciones en el metabolismo glucídico, un estado protrombótico además de pro-inflamatorio. (Giraldo, 2009; Ríos, 2010)

Causas de las lesiones cutáneas

Una de las principales causas de las lesiones cutáneas es un desbalance entre la síntesis de citocinas pro y antiinflamatorias y a su actividad, el cual es un proceso muy complejo, en donde se ve implicada la interacción de dichas moléculas a través de una cascada de señalización formando complejos inmunes que permiten la perpetuación de la enfermedad. (Manukyan, 2010; Shachar, 2012)

Durante el proceso de inflamación la participación de citocinas con función pro-inflamatoria es fundamental, esta respuesta pro-inflamatoria es regulada por moléculas anti-inflamatorias. En condiciones normales todas estas moléculas sirven como inmunomoduladoras y por lo tanto, limitan el efecto potencialmente dañino, sin embargo, en condiciones patológicas la respuesta anti-inflamatoria es insuficiente para controlar la inflamación. (De Pablo, 2005)

Se ha observado que la desregulación de la síntesis de citocinas juega un papel importante en las lesiones provocadas por LES, LED, Pustulosis Amicrobina y pénfigo foliáceo. Múltiples citocinas han sido implicadas en la actividad de cada una de las enfermedades, como es el caso de interferón (IFN), interleucinas: 10, 17, 6 y 1, así como el factor de necrosis tumoral (TNF). Por lo tanto podrían ser

utilizadas como marcadores para identificar de qué patología se trata, para dar un mejor diagnóstico y por ende un mejor tratamiento. (Urra, 2012)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- **PCR punto final**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática que consiste en sintetizar una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada. (Tamay, 2013)

Los elementos importantes en la reacción son:

- *Taq* DNA polimerasa, proviene de la bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en altas temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima de otras DNA polimerasas es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas.
- Los primers específicos, son secuencias de nucleótidos que delimitan la secuencia blanco en la parte sentido (5'-3') y antisentido (3'-5'). Generalmente el tamaño del primer oscila entre 15-25 pb y la cantidad de G-C no debe ser más del 55%, con una temperatura de alineado que puede variar de 45 a 70°C.
- Los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), son las bases nitrogenadas con los que la *Taq* DNA polimerasa sintetiza las nuevas cadenas de DNA, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la *Taq* DNA polimerasa. Normalmente se utilizan en una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM de cada uno.
- Cloruro de magnesio o sulfato de magnesio, ya que el magnesio es un cofactor de la DNA polimerasa, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte la actividad de la *Taq* DNA polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5-2.5 mM.
- La reacción debe darse en un ambiente amortiguado por lo que es necesario la adición de un buffer de Tris- HCl (pH=8) en una concentración final de 200mM.

- Templado o molde (DNA o cDNA), puede ser de cadena sencilla o doble con una buena integridad para poder amplificar la región de interés.

Los equipos donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo de temperatura, tiempo y número de ciclos. (Tamay, 2013)

Todos los elementos interactúan en tres etapas principales y son las siguientes:

1. Desnaturalización: etapa en la que se separa la doble cadena del DNA y las cadenas sencillas adoptan forma lineal. mediante una breve incubación a una temperatura de 95°C (Qiagen), esta temperatura varía dependiendo de la marca de la *Taq* DNA polimerasa que se utilice, pero siempre es superior a la temperatura de alineamiento de la región a amplificar.
2. Alineamiento o hibridación: temperatura en donde los oligonucleótidos se unen a las secuencia blanco del DNA, formando una pequeña región estable de doble cadena. La temperatura puede variar entre 40° y 70°C.
3. Extensión o polimerización: 72°C temperatura a la cual la *Taq* DNA polimerasa alcanza su máxima actividad, y empieza a copiar el ADN molde en sentido 5'-3', a partir de los oligonucleótidos previamente alineados. (Luque, 2011; Espinosa, 2014)

Este proceso se repite entre 30 a 40 ciclos, en cada uno de ellos se aumentará la cantidad de la secuencia DNA de interés en 2^n (Figura 5). Cabe mencionar que generalmente se usan dos pasos adicionales: uno de 95°C por 10 min, para iniciar con la desnaturalización, y uno de 72°C por 10 min que permite que la *Taq* DNA polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pudieron haber quedado incompletos. (Espinosa, 2014; Luque, 2011)

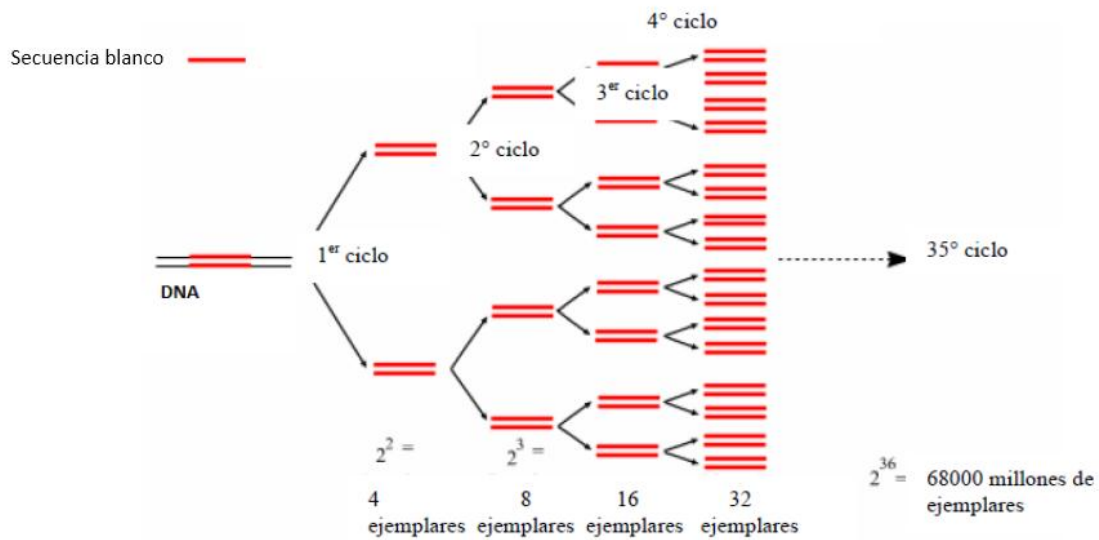


Figura 4. Amplificación exponencial del DNA mediante PCR. (Modificado, (Somma, 2014))

- **PCR tiempo real (qPCR)**

A diferencia del PCR punto final el PCR tiempo real es más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. El objetivo de esta técnica es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. (Tamay, 2013)

Mediante la detección de la fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA sintetizado. (Costa, 2004)

Los termocicladores para llevar a cabo el qPCR tienen incorporado un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir en cualquier momento la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Las sustancias que emiten la fluorescencia pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos. (Costa, 2004)

- Agentes intercalantes

Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al DNA de doble hélice. (Costa, 2004) El más empleado en qPCR es el SYBR Green, la cual es una molécula cargada positivamente que tiene la propiedad de intercalarse al DNA de doble cadena dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad del producto de PCR. (Tamay, 2013)

- Sondas de hibridación específicas

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas *Molecular Beacons* y las sondas FRET. (Costa, 2004)

Para la cuantificación de la concentración inicial de DNA (o RNA) en la muestra se añaden controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de DNA (curva estándar, Figura 5) en el ciclado de amplificación. En el qPCR el *software* muestra el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de DNA) en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles. (Costa, 2004)

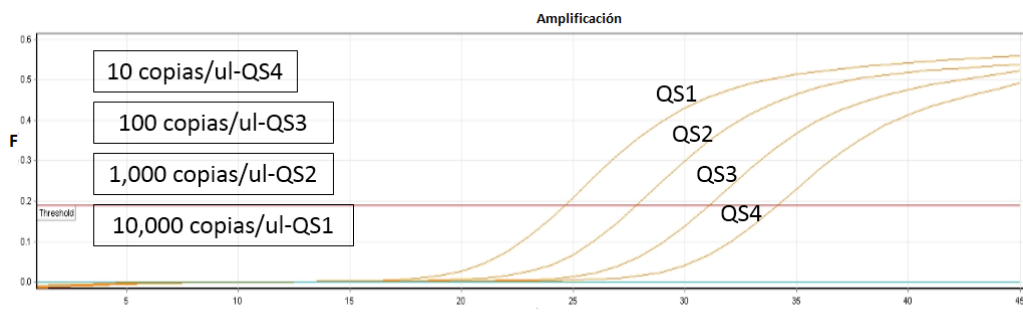


Figura 5. Curva estándar para cuantificación. Se muestra la amplificación de los controles con sus respectivos valores. Fluorescencia (F)

Para cada muestra el *software* calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la

señal de base. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de corte (Cp, de crossing point) o ciclo umbral (Ct, de threshold cycle) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de DNA presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus Cp correspondientes se dibuja una curva patrón (Figura 7) y se interpolan en ella los valores de los Cp de cada muestra problema para inferir la concentración de DNA inicial.

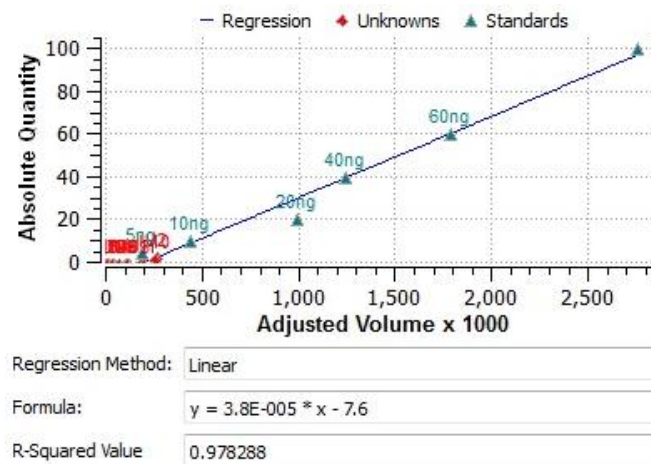


Figura 6. Curva patrón.

ANTECEDENTES

Factores que influyen en el desarrollo de enfermedades autoinmunes

Los factores ambientales, la prescripción de algunos fármacos y agentes infecciosos influyen de manera importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Un factor ambiental que juega un papel importante es la radiación ultravioleta ya que conduce la liberación por parte de las células epidérmicas de citocinas como el TNF- α y la IL-1 que a su vez desencadenan la síntesis de otras citocinas pro-inflamatorias, esto conlleva la activación de linfocitos y la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y los queratinocitos. Por otra parte, la radiación UV induce la apoptosis de los queratinocitos y la expresión de auto-antígenos en su superficie (Figura 7). (Bielsa, 2010)

En condiciones normales, las células apoptóticas son eliminadas de forma rápida del organismo para evitar la liberación de las enzimas intracelulares y la exposición de auto-antígenos. Anomalías en la eliminación de las células apoptóticas han adquirido relevancia como origen de las manifestaciones de LES y LEC. No obstante, no está claro si el fallo radica en un déficit en los mecanismos de eliminación de las células apoptóticas con la consiguiente acumulación de las mismas, o en una eliminación inflamatoria. (Bielsa, 2010)

Como consecuencia de los déficits en su procesamiento, las células apoptóticas sufren necrosis secundaria y de desencadenan estímulos pro-inflamatorios, este proceso conduce a la exposición de auto-antígenos en la superficie celular, los cuales sufren modificaciones durante la apoptosis. La unión de auto-anticuerpos a estos antígenos daría lugar a una respuesta inflamatoria y la consiguiente producción de citocinas (Figura 7). (Bielsa, 2010)

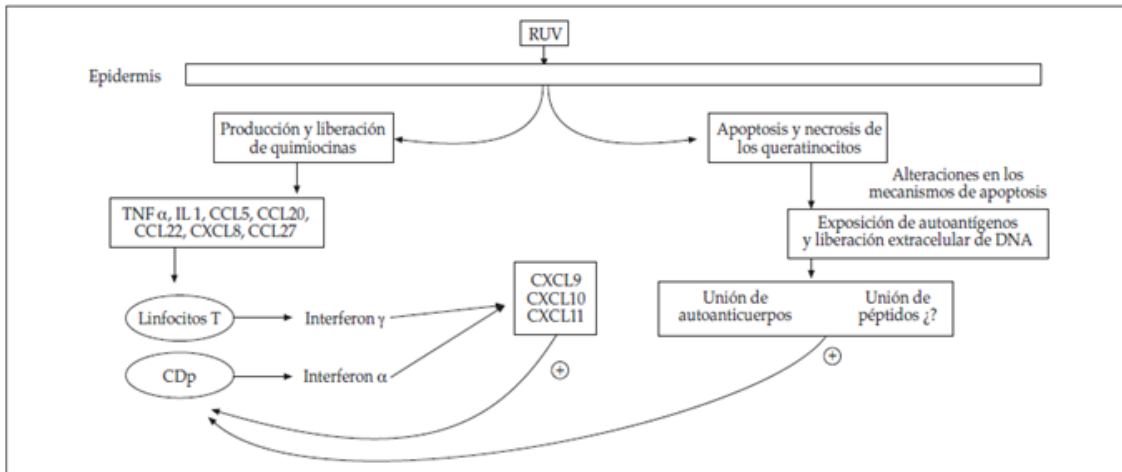


Figura 7. Principales eventos que podrían intervenir en el mecanismo patogénico de las lesiones cutáneas de LE. (Bielsa, 2010)

La prescripción de ciertos fármacos en donde se incluyen antibióticos (D-penicilamina penicilina, cefalosporinas y rifampicina), medicamentos para el tratamiento de padecimientos cardiacos (captopril, enalapril, la quinidina, la procainamida e hidralazina) y fármacos antipsicóticos pueden contribuir al desarrollo de alguna enfermedad autoinmune. (Enríquez, 2013; Magged, 2003; Marcano, 2014; Valencia, 2011)

También los virus y las bacterias (Ejemplo: *Staphylococcus* spp), pueden afectar el sistema inmunológico haciéndolo más susceptible a su desregulación lo cual permite el desarrollo de enfermedades autoinmunes. (Enríquez, 2013; Magged, 2003; Marcano, 2014; Valencia, 2011)

Las personas que no presentan ninguna enfermedad autoinmune secretan anticuerpos anti-Sm que están dirigidos al DNA bacteriano, mientras que en las personas con lupus estos anticuerpos son dirigidos contra el DNA de todas las células; por lo tanto se postula la hipótesis que en la síntesis de estos anticuerpos anti-DNA bacteriano se dé un cambio y reconozca el DNA del huésped. (Sánchez, 2004)

Algunos genes están involucrados en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, los cuales se localizan en los cromosomas 1, 4 y 6. Hay tres candidatos fuertes: el primero, que corresponde al gen del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II (MHC-II); el segundo, que codifica para proteínas del complemento (componente fundamental de la respuesta inmune, consta de un conjunto de proteínas cuyas funciones es lisar la célula, bacteria o virus y la opsonización que promueve la fagocitosis) y un tercero, que afecta receptores IIa y IIIa de inmunoglobulinas. Sin embargo, una docena de genes están siendo investigados; no es clara su participación, aunque algunos están involucrados en la actividad de las células B y T y otros, en la tolerancia. (Sánchez, 2004)

Citocinas como marcadores para enfermedades autoinmunes

Como se mencionó anteriormente las citocinas juegan un papel importante en la actividad de enfermedades autoinmunes. El conocimiento de las citocinas no sólo proporciona una nueva comprensión en la patogénesis del LES, el LEC, la pustulosis u otras enfermedades, sino también permite el desarrollo de aplicaciones clínicas tales como el seguimiento de la enfermedad. (Urra, 2012)

Nürnberg y colaboradores examinaron la expresión del RNA mensajero (mRNA) para interleucina- 6 (IL-6) en la capa epidérmica de la piel afectada y no afectada en pacientes con LED, donde observaron un aumento significativo de la expresión dicha citocina. (Carneiro, 2011)

Usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), Stein y colaboradores estudiaron la producción de mRNA de Interleucinas (IL-10, 4, 2, y 5) e Interferón-gamma (INF- γ), en muestras de piel de voluntarios sanos y de pacientes con LES, detectando una sobreexpresión de IFN- γ e IL-5 en la mayoría de muestras de pacientes con LES, expresión de IL-10 en la mitad de las muestras con LES, IL-2 en un par de muestras e IL-4 no se detectó. Mientras que en las muestras normales sólo había expresión de IFN- γ e IL-10.

Utilizando un enfoque similar, Toro y colaboradores demostraron que existen niveles elevados de IFN- γ , IL-2 y del factor de necrosis tumoral- alfa (TNF- α) en muestras de piel de lesiones de LED. (Carneiro, 2011)

Diversos investigadores han trabajado con otras citocinas como el caso de Balenescu y colaboradores que mediante citometría de flujo detectaron un número elevado de células Th17 circulantes en pacientes con LES Y LED, y por ende elevadas concentraciones séricas de IL17 e IL-23. (Balenescu, 2010)

Análisis de laboratorio en sangre u orina realizados en pacientes con pustulosis amicrobiana muestran un aumento en las concentraciones de IgE (2.960 UI; rango normal 0-380 UI/ml); así como de IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- α . (Antille, 2008; Marzano, 2011)

Interferón

Una de las citocinas producidas durante el proceso de inflamación son los interferones (IFNs), su nombre deriva de la capacidad de interferir con las células huésped de virus durante el proceso de infección y han sido fuertemente asociadas con la patogénesis del LES y del LED, como ejemplo tenemos interferón de tipo I que incluye al IFN- α y IFN- β . (Kaplan, 2011)

El IFN- α enlaza a los sistemas inmunes innato y adaptativo y por tanto es un componente crítico de la autoinmunidad. Un número de genes está implicado en la regulación de IFN- α y ha sido asociado con LES. Los individuos que han recibido tratamiento para otros trastornos como el caso de hepatitis C o con tumores malignos y utilizan IFN- α han desarrollado lupus. (Connolly, 2012; Urra, 2012)

Las células dendríticas plasmáticas (pDC) son la fuente principal de IFN- α . Estas células son importantes en el inicio de la respuesta inmune, así como en el mantenimiento de la tolerancia periférica, son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune y para evitar el desarrollo de enfermedades

autoinmunes. Por lo tanto han sido implicadas como mediadores clave en el lupus ya que los niveles séricos elevados de IFN- α se deben al aumento de las células dendríticas plasmáticas. (Kaplan, 2011)

Debido a la importancia que tienen las células dendríticas en el sistema inmune y con relación al desarrollo de enfermedades autoinmunes se han utilizado como marcadores para la distinción entre la hipertrofia provocada por LES con respecto a la hipertrofia provocada por carcinoma de células escamosas (SCC). Para ello se utilizan biopsias de piel donde se marcan a las células dendríticas con anti-CD123+, y se observa que el patrón de tinción es distinto para la hipertrófica provocada por LES de aquella que es provocada por SCC, ya que se muestra como una banda de las células en la unión dermo-epidérmica; mientras que es las biopsias de SCC se observan células dendríticas individuales o en pequeños grupos dispersos. Por lo tanto el patrón de tinción con anti-CD123+ puede ser una característica útil para distinguir lupus eritematoso hipertrófico de carcinoma de células escamosas. (Ko CJ, 2011)

Interleucinas

Las interleucinas también se encuentran fuertemente vinculadas a la fitopatología del LES, del LED, de la pustulosis, de la psoriasis y del pénfigo. Los genes que codifican para estas proteínas han sido ampliamente examinados como posibles candidatos de susceptibilidad del sistema inmune a desarrollar una enfermedad autoinmune. (Carneiro, 2011)

La interleucina (IL)-10, que es un importante inmunorregulador que inhibe la función de macrófagos, células dendríticas y linfocitos T; suprime la síntesis de citocinas pro-inflamatorias tales como IFN- α , IL-1, IL-5, IL-6, IL-12; y estimula el crecimiento y/o la diferenciación de linfocitos B, induciendo la producción de anticuerpos. (Carneiro, 2011; Davis, 2011; Lourenco, 2013; Urra, 2012)

Aparte de las células Th1 y Th2 hay un subconjunto que produce IL-17, las células efectoras T auxiliares, llamadas células Th17, cuya desregulación participa en enfermedades autoinmunes. El Factor de Crecimiento Transformante (TGF)- β , IL-6, IL-21 e IL-23, son importantes para la formación de Th17. IL17 actúa en sinergia con otras citocinas en particular con IL-1, TNF- α y IFN- γ . (Lombardi, 2007; Waite, 2011)

En particular la IL-17 es capaz de estimular la producción de quimiocinas y citocinas de múltiples células, como células epiteliales y fibroblastos, para promover la proliferación, maduración y el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y linfocitos en el sitio de inflamación.

Balenescu y colaboradores encontraron un aumento de los niveles de IL-17 en el suero de pacientes con LED y LES en comparación a controles sanos, también hay un aumento de la IL-23 en LES LED, pero no hay diferencia significativa con respecto a los controles sanos. (Balenescu, 2010)

La IL-23 es una citocina heterodimérica compuesta por una subunidad p19 y otra subunidad p40 común con la IL-12. La IL-23 y la IL-12 comparten moléculas intracelulares de transducción de señales, por lo tanto ambas exhiben alguna función de superposición en la promoción de la inmunidad celular. En estudios se demostró que en los niveles de mRNA de IL-23 p19 fueron significativamente mayores en los pacientes con LES. (Alunno, 2012; Balenescu, 2010)

La interleucina-18 (IL-18) estimula la producción de INF- γ en macrófagos y linfocitos T, puede actuar sinérgicamente con IL-12 o independiente a ella, para promover el desarrollo de células Th1. En pacientes con LES, LEC y psoriasis se ha visto una expresión elevada de IL-18 en suero. (Giraldo, 2009; Lourenco, 2013; Shui- LianYu, 2012)

Factor de Necrosis Tumoral (TNF)

El Factor de Necrosis Tumoral (TNF) puede tener efectos protectores o acelerar la enfermedad autoinmune, pero esto depende de cada individuo y el grado de actividad de la enfermedad. Es una de las principales citocinas secretada por los macrófagos, monocitos, linfocitos, queratinocitos y fibroblastos, en respuesta a la inflamación, infección, lesión y otros problemas ambientales. Tiene un efecto citotóxico directo sobre ciertas células tumorales, pero no sobre las normales. (Sacre, 2012)

TNF- α no sólo es una citocina pro-inflamatoria potente sino que también desempeña un papel importante en la activación de linfocitos y leucocitos y la migración, la fiebre, respuesta de fase aguda, la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. (Sacre, 2012)

Varios estudios han reportado que el TNF- α aumenta en las lesiones de pieles de pacientes con LES, LED y psoriasis en comparación a los controles. (Giraldo, 2009; Nabatian, 2012)

Adam Nabatian y colaboradores evaluaron la producción de TNF- α en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) extraídas de pacientes con LED, LEC y de controles sanos. Para ello una vez aisladas las PBMCs fueron cultivadas en un medio determinado por los mismos investigadores, para que se diera una acumulación de proteínas y TNF- α , el cual posteriormente fue cuantificado por ELISA. Utilizando citometría de flujo y los marcadores específicos del tipo celular determinaron la fuente principal de TNF- α . Los resultados de su estudio demostraron que existe un elevado nivel de expresión de TNF- α en los pacientes con LED con respecto a los pacientes con LEC y los controles sanos. (Nabatian, 2012)

Quimiocinas

Las quimiocinas son un grupo de citocinas pequeñas (8 a 12kDa) con propiedades quimiotácticas, poseen cuatro residuos de cisteína invariables, casi todas caen en uno u otro de dos subconjuntos distintivos:

1. Quimiocinas del subconjunto CC, en donde las cisteínas conservadas son contiguas.
2. Quimiocinas del subconjunto CXC, en donde las cisteínas conservadas están separadas por algún otro aminoácido (X).

Estas citocinas están involucradas en la migración celular necesaria para el inicio de la respuesta inmune, inducen la atracción de células efectoras a los sitios de inflamación y regulan el reclutamiento de linfocitos Th (Th1 y Th2). (Shui- LianYu, 2012)

Se ha encontrado que tanto CXCL10 como CXCL9 se expresan de manera abundante en los pacientes con lesiones en la piel. Ambas quimiocinas estimulan la desgranulación de los neutrófilos para liberar los radicales de oxígeno y con ello inducir una respuesta inflamatoria aguda. (Shui- LianYu, 2012; Wenzel, 2007)

Algunos investigadores han analizado el papel que juegan CXCL9 y CXCL10 en el LEC. Para ello han evaluado la expresión del mRNA de ambas quimiocinas en pacientes con LEC, obteniendo como resultado, una expresión elevada de CXCL9 y CXCL10 en los pacientes con LEC en comparación con los controles sanos. (Gambichler T. e., 2012)

También la inmunohistoquímica en biopsias de pieles de pacientes con diferentes tipos de LEC permite observar la importancia de CXCL9 y CXCL10 como reclutadores de linfocitos efectoras. (Wenzel, 2007)

JUSTIFICACIÓN

La evaluación de los niveles de expresión de las citocinas inflamatorias por qPCR, como se realizan en otros países, ha permitido caracterizar mejor enfermedades autoinmunes como el LEC y la psoriasis. En nuestro caso, se pretendió analizar el patrón de expresión de las citocinas IL-17, IL-18, IL-23, TNF- α , IFN- α , CXCL9 y del factor de transcripción FOXP3 en pacientes con pustulosis amicrobiana para compararlo con el patrón de expresión de LED, LES y pénfigo.

Este tipo de análisis se sumaría a las pruebas de diagnóstico que generalmente se realizan en México, como la biopsia de piel para observar los patrones histopatológicos, examen clínico general y de laboratorio, entre otros; para poder diferenciar entre un lupus cutáneo y una pustulosis amicrobiana, para lograr un mejor diagnóstico y por ende un mejor tratamiento.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar mediante qPCR la expresión de citocinas inflamatorias en pacientes con Pustulosis Amicrobiana en comparación con pacientes que presenten Lupus Eritematoso Discoide (LED), Pénfigo, Lupus Eritematoso Sistémico (LES) o con Pustulosis Asociada con Enfermedades Autoinmunes (APAD).

Objetivos Particulares

- Observar la variación de la expresión de las citocinas entre las diferentes patologías analizadas.
- Utilizar las citocinas como marcadores en lesiones apollosas provocadas por enfermedades autoinmunes.

MÉTODOS

Selección de muestras

Se realizó una búsqueda retrospectiva de hace 12 años de bloques de pieles en el banco de tejidos embebidos en parafina del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) de pacientes con pénfigo, con LES, con LED, con pustulosis amicrobiana y con pustulosis amicrobiana asociada con enfermedades autoinmunes (APAD). Asimismo se buscaron bloques de pieles sanas o con patología diferente, los cuales se utilizaron como controles negativos.

Extracción de RNA

De cada bloque de piel se realizaron 8 cortes de 5 µm con un microtómo y fueron depositados en tubos de polipropileno de 1.5 ml. Entre cada bloque se realizó limpieza con *RNase Away Reagent* para evitar la contaminación de un tejido con otro, o con algún otro agente contaminante. La extracción de RNA se realizó con el kit Promega RNA FFPE (USA, Madison), siguiendo su protocolo. Se añadieron 500 µl de aceite mineral a cada tubo para eliminar la parafina, se homogenizó e incubó a 80°C durante un minuto, posteriormente se agregaron 100 µl de buffer de lisis y se centrifugó a 10000 rpm por 15 segundos; esto para obtener dos fases, fase acuosa y fase orgánica. A la fase acuosa se le añadieron 10 µl de proteinasa K, se incubó a 56°C por 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 30 µl de DNasa, dejando reposar por 15 minutos a 20-25°C. Posteriormente se añadieron 325 µl del buffer BL y 200 µl de isopropanol 100% (JT Baker), se homogenizó y se centrifugó a 10000 rpm por 15 segundos, para obtener nuevamente dos fases. La fase acuosa se transfirió a una columna del kit y se centrifugó a 10000 rpm por 30 segundos.

Posteriormente la columna se lavó 2 veces con buffer de lavado (500 µl), se centrifugó y se le adicionaron 50 µl de buffer de elución e incubó por 2 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto, para recuperar el RNA, el cual se guardó a -80°C hasta su uso.

Cuantificación de RNA

Se colocó 1 μ l de RNA en el espectofotómetro (Smart Spec™ Plus Spectrophotometer, BIO-RAD), para determinar la concentración en nanogramos por microlitro de muestra y con ello calcular los nanogramos totales de RNA de cada una de las muestras.

Síntesis de cDNA

Se colocaron 100 ng en un tubo de polipropileno, siguiendo el protocolo de Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, USA): 2 μ l de dNTPs (5 mM de cada uno), 1 μ l de omniscript Reverse Transcriptase (4 U/ reacción), 2 μ l de Buffer RT (10X). Además se adicionaron 2 μ l de oligo dT (500 ug/ml, Promega USA), 1 μ l de inhibidor de RNasa (20 U/ μ L, Life technologie, USA) y agua, para un total de 25 μ l. Se homogenizó e incubó a 42°C por 60 min. La enzima se inactivo con una incubación a 95°C por 15 min.

Diseño de los primers

Se obtuvieron las secuencias de los genes de las citocinas a estudiar del sitio *ensembl.org*, para diseñar los primers con el programa Primer Express (Life Technologies, USA), Tabla 3. La ventaja que nos brinda el sitio *ensembl* es que nos da la secuencia del gen únicamente con los exones, lo cual facilita el diseño de primers, considerando solamente las condiciones como tamaño del fragmento deseado, la proporción de G-C, la longitud de los oligonucleótidos, así como la temperatura de alineado requerida. Como se muestra en la siguiente figura:

Primer Express 2.0 - [DNA PCR #3]

File Edit Options Window Help

Sequence Params Rxn Cond **Primers** Map Recipe Results

Forward Primer				Reverse Primer				Amplicon						
Start	Length	Tm	%GC	Primer	Start	Length	Tm	%GC	Primer	Length	Tm	%GC	Ta	Pe
23	21	59	57	TGGTGTCACTGCTACTGCTGC	73	20	59	55	TTCTGCCTTCACTATGGCC	51	83	57	81	
223	20	59	50	AATCTCCACCACAATGAGGA	278	21	59	52	TTTGCTCCAGATCACAGAG	58	81	52	59	

→ IL-17

→ ←

```

ACCTCATTGGTGTCACTGCTACTGCTGCTGAGCCTGGAGGCATAGTGAAGGCAGGAATCACAATCCCA
GAAATCCAGGATGCCCAAATTCTGAGGACAAGAACTTCCCGGACTGTGATGGTCAACCTGAACATCCA
TAACC GAATAACCAATACCAATCCAAAAGGTCCTCAGATTACTACAACGATCCACTCACCTTGGAA
CTCCACCGCAATGAGGACCCTGAGAGATATCCCTCTGTGATCTGGGAGGCAAAGTGC CGCCACTTGGGCT
GCATCAACGCTGATGGGAACGTGGACTACCACATGAACTCTGTC CCATCCAGCAAGAGATCCTGGTCCT
GC CAGGGAGCCTCCACACTGCCCAACTCCTTCCGGCTGGAGAAGATACTGGTGTCCGTGGCTGCACC
TGTGTCACCCGATTGTCCACCATGTGGCCTAA
  
```

Optimal Primer Pairs Only Order... Save List... Display...

Figura 8. Diseño de los primers en el programa Primer Express 2.0. Mostrando como ejemplo la secuencia de IL-17 obtenida de la página ensembl.org.

Tabla 2.Primers diseñados de las citocinas a estudiar.

Nombre	Sentido	Antisentido	Temperatura de alineado (TM, °C)	Tamaño del producto (pb)
CXCL9	CCAGAATCGAAGGCCATCAA	CCTTTTCCTTGCTAACTGCTTTCAG	59	51
FOXP3	CTGGGAAAATGGCACTGACC	CCTTGTCGGATGATGCCAC	59	51
IL-17	TGGTGTCACTGCTACTGCTGC	TTCCTGCCTTCACTATGGCC	59	51
IL-18	AGATAATGCACCCCGGACC	AGCCATACCTCTAGGCTGGCT	58	67
IL-23	CTCCTGCAGCCTGAGGGTC	TGAGGCTTGGAAATCTGCTGAG	60	52
IFN- α	GTCAAGCTGCTCTGTGGGT	CTACCCAGGCTGTGGGTTTG	59	51
TNF- α	AGCCCATGTTGTAGCAAACCC	G TTCAGCCACTGGAGCTGC	60	52
Primers Previos				
β -actina	TAATGTCACGCACGATTTCCC	TCACCGAGCGCGGCT	57	250

PCR punto final para amplificación del gen constitutivo

Se realizó un PCR con el cDNA de cada una de las muestras para amplificar un gen constitutivo (β -actina) para evaluar su integridad y calidad. Para la reacción de PCR se utilizaron 1 μ l de cDNA, se adicionó 1 μ l de primer sentido (50 pM) y 1 μ l de primer antisentido (50 pM), 12.5 μ l de master mix (que incluye MgCl₂, Taq DNA polimerasa y nucleótidos (dNTPs, Qiagen, USA) y agua cuanto fuera necesario para 25 μ l totales. La mezcla se homogeneizó y se colocó en un termociclador Veriti Applied Biosystems con el siguiente programa:

95°C, 5 min
95°C - 1 min
TM (ver Tabla 3), 1 min } 40 ciclos
72°C- 1 min
72°C, 5 min

Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Una vez finalizado el PCR se analizaron las muestras por electroforesis en un gel de agarosa al 1.8%, teñido con SYBR Green, en TAE 1X corrido durante 45 min a 120 volts. (Ver anexo), junto con un marcador de peso molecular de 50 a 2000 pb (Invitrogen, USA). Después el gel fue analizado en un transiluminador de geles, Gel Doc™ EZ Imager (BIO-RAD, USA).

Para poder considerar que el cDNA de cada una de las muestras contaba con una buena integridad, al analizar el gel se tenía que observar una banda de 250 pb que pertenece al gen constitutivo que colocamos (β - actina). Las bandas deben mostrarse como bandas individuales, únicas, y limpias. Con estos marcos de referencia podríamos considerar que el cDNA de las muestras a analizar cuenta con una buena integridad.

PCR punto final para verificar que los primer reconocen la secuencia blanco

Una vez que se verificó en la página National Center for Biotechnology Information (NCBI) en el gen bank, que los primers reconocían la secuencia de las citocinas a estudiar, se realizó un PCR punto final con las mismas condiciones de temperatura que para el gen constitutivo.

Después del PCR las muestras fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa; junto con un marcador de peso molecular y con un marcador de peso con masa. El gel fue analizado en un transiluminador, Gel Doc™ EZ Imager (BIO-RAD, USA).

PCR tiempo real

Curva estándar

El gel con el que se analizaron las muestras junto con el marcador de peso con masa nos sirvió para determinar el número de copias del producto de PCR, para ello se obtuvieron los índices de densidad de cada una de las muestras y del marcador de peso con masa, por ejemplo el índice de densidad (ID) de IL-17 es de 680,242 y para el marcador de peso con masa de la banda de 5 ng es de 773,980.

El marcador de peso con masa tiene 5 ng de DNA por banda, para obtener los nanogramos de la muestra se realizó la siguiente operación:

$$680,242 \text{ ID de IL-17} \left(\frac{5 \text{ ng}}{773,980 \text{ ID del marcador de masa}} \right) = 4.394 \text{ ng}$$

4.394 ng en 5 μl , que es el volumen de muestra cargado en el gel.

$$4.394 \text{ ng} / 5 \mu\text{l} = 0.8788 \text{ ng} / \mu\text{l} = 8.788 \times 10^{-5} \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

Una vez obtenidos los microgramos por microlitro presentes en la muestra, se calculó la cantidad de pares de bases en el amplicón, realizando la siguiente operación:

$$51 \text{ pb} \times 660 \text{ g/mol/pb} = 33,660 \text{ g/mol}$$

Donde 51pb es el tamaño del producto amplificado del PCR para el gen de IL-17 y 660 el peso molecular de un par de bases.

Teniendo ese valor se realiza la siguiente operación para obtener el número de copias de DNA por microlitro de solución.

$$\frac{8.788 \times 10^{-10} \text{ g} / \mu\text{l}}{33,660 \text{ g/mol}} \times 6.021237 \times 10^{23} = 1.57 \times 10^{10} \text{ copias} / \mu\text{l}$$

Donde:

6.021237×10^{23} es el número de Avogadro

De la operación anterior se obtuvo el número de copias por microlitro, con este valor se calculó en que volumen hay 1×10^{10} copias.

$$1 \times 10^{10} \left(\frac{1 \mu\text{l}}{1.57 \times 10^{10}} \right) = 0.6369 \mu\text{l}$$

Para hacer las diluciones tomamos 6.369 μl de muestra y agregamos 3.631 μl de H_2O obteniendo una solución con 1×10^{10} copias/ μl , después a esta solución le agregamos 90 μl de H_2O obteniendo una solución con 1×10^9 copias/ μl , y así se continuaron haciendo diluciones seriales hasta 1×10^2 .

Mezcla de reacción para el qPCR

Para realizar el qPCR utilizamos el sistema de Quanti Tect Master mix SYBR Green, PCR kit Qiagen, USA. En cada pozo de la placa para qPCR se colocaron 12.5 μl de master mix (Qiagen), la cual cuenta con *Taq* DNA polimerasa, dNTPs, MgCl_2 y SYBR Green; 1 μl de primer sentido, 1 μl de primer antisentido, 9.5 de H_2O . Posteriormente fueron colocadas las muestras, en los primeros pozos se colocaron los controles externos (diluciones seriales) de 1×10^6 a 1×10^2 , 1 μl , seguidos de las muestras problema (1 μl de cDNA) y el control negativo (1 μl de H_2O del kit), así para cada una de las citocinas. Cabe mencionar que tanto las muestras como las curvas fueron evaluadas por duplicado.

La placa se colocó en el termociclador 7500 real time PCR System de Applied Biosystems con el siguiente programa:

95°C, 5min

95°C, 50s

TM (ver Tabla 2), 50s

72°C, 50s

} 40 ciclos

Análisis estadístico

Una vez recopilados los datos del programa computacional de qPCR se realizaron análisis estadísticos utilizando la t de Student, el promedio y la desviación estándar con el Software Microsoft Office Excel.

RESULTADOS

Para la elección de casos se realizó la búsqueda retrospectiva en el archivo de patología del Instituto de Nutrición de 12 años y se eligieron los bloques que contaban con material biológico suficiente, además de tener una laminilla teñida con HE y de ser posible tener inmunohistoquímica para comparar. Al final sólo elegimos 7 bloques de pacientes con APAD, 5 con pustulosis amicrobiana, 3 con LES, 3 con LED y 5 de piel sana (controles negativos). Todas las muestras fueron procesadas durante el mismo periodo.

Una vez que se realizó la extracción de RNA de cada uno de los bloques y la síntesis del cDNA, se evaluó su integridad, para ello se realizó un PCR punto final para el gen constitutivo de β -actina y se analizó con una electroforesis en gel de agarosa, donde obtuvimos para cada una de las muestras una banda individual, única y limpia de 250pb, por lo tanto nuestro cDNA contaba con una buena integridad (Figura 9)



Figura 9. Amplificación por PCR de β -actina en muestras de cDNA. Electroforesis en gel de agarosa 1.8% teñido con SYBR Green. Para cada una de las muestras se observa una banda de 250pb, lo que indica que el material genético cuenta con una buena integridad. Pustulosis Amicrobiana (PA), Pustulosis Asociada con Enfermedades Autoinmunes (APAD), Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Lupus

Una vez diseñados los primers con el programa Primer Express y se realizó un blast en la página National Center for Biotechnology Information (NCBI) para verificar que los primers de cada una de las citocinas reconocen solamente a la secuencia blanco, se calculó la TM y posteriormente se realizó un PCR punto final con las mismas condiciones en el tiempo de ciclado que para el gen constitutivo (β -actina). Los productos del PCR fueron analizados con una electroforesis en gel de agarosa, donde además de utilizar el marcador de peso molecular se utilizó un marcador de peso con masa. Como se puede observar en la Figura 10 hubo amplificación de las secuencias de interés, obteniendo un amplicón entre 50-60 pb como se esperaba (Ver tabla de los primers), lo que nos indica que los primers utilizados sí funcionan.

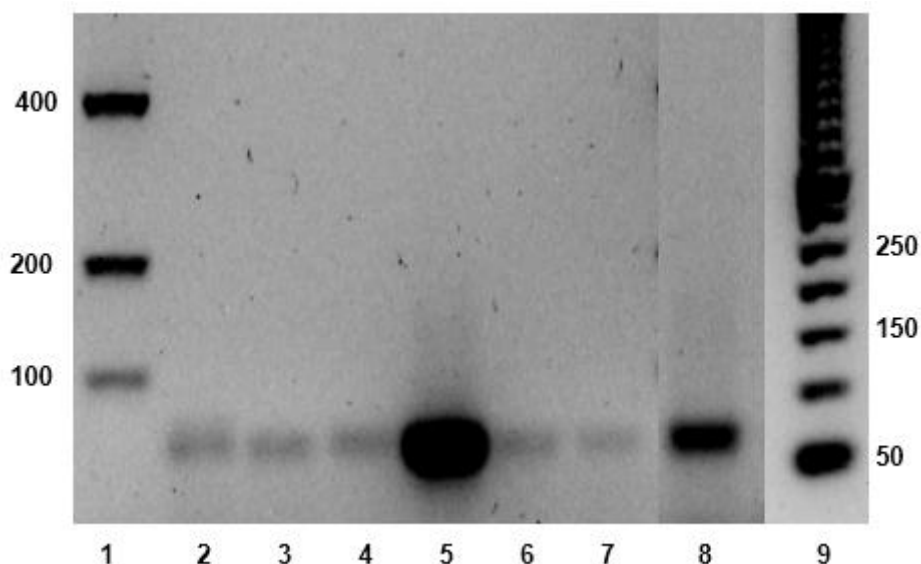


Figura 10. Gel de agarosa 1.8%, teñido con SYBR Green. Del carril 2-8 se encuentran las muestras del PCR punto final en el siguiente orden: IL-17, IFN- α , IL-18, TNF- α , CXCL9, IL-23 Y FOXP3. En el carril 1 el Marcador de Peso con Masa (MM), (100 pb=5 ng, 200 pb= 10 ng, 400 pb=20 ng), carril 2 el Marcador de peso molecular (MPM)

Posteriormente con el programa Image LabTM Software se obtuvieron los índices de densidad (ID) para cada una de las citocinas analizadas, para realizar los cálculos necesarios y generar la curva estándar para cada gen de interés.

Para el qPCR se colocó en cada uno de los pozos de la placa la mix para cada una de las citocinas, posteriormente se añadieron las muestras (cDNA) y las curvas (de 1×10^6 a 1×10^2), el orden se muestra en el siguiente diagrama:

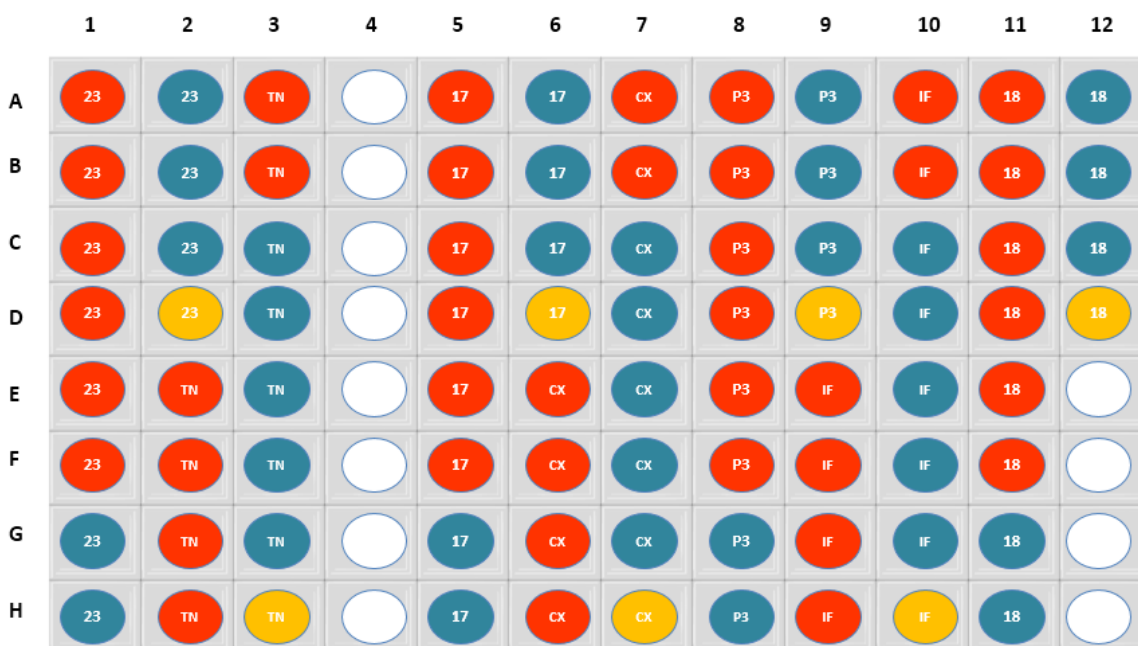


Figura 11. Placa para el qPCR. Los pozos de color naranja representan los controles externos (diluciones seriales), los azules representan las muestras de cDNA para cada una de las enfermedades (PA, APAD, LES, LED, PF) y los amarillos el control negativo (H_2O de kit). IL-23 (23), TNF- α (TN), IL-17 (17), CXCL9 (CX), FOXP3 (P3), IFN- α (IF) e IL-18 (18).

Cabe mencionar que tanto las curvas como las muestras se corrieron por duplicado, es decir se realizaron dos placas para qPCR iguales. En la primera corrida se eligió una muestra de cada una de las enfermedades, posteriormente se trabajó con el resto de las muestras y los controles negativos (pieles sanas) realizando el mismo procedimiento.

Después de cada corrida de qPCR se recolectaron los valores obtenidos del *software*, los cuales representan el número de copias por microlitro de la citocina para cada una de las muestras. Posteriormente estos datos fueron analizados en Excel mediante t de Student.

El análisis estadístico de los resultados mostró un aumento significativo de la expresión de IL-17 en los pacientes con pustulosis con respecto a los grupos de LED, APAD y los controles negativos (Figura 12a); asimismo los niveles de IL-23 son elevados para el grupo de pustulosis, mostrando una diferencia significativa con respecto a los demás grupos como se observa en la figura 11b. Para esta citocina también encontramos que el grupo de los APAD mostró una expresión elevada y significativa con respecto a los grupos de LES, LED y controles negativos.

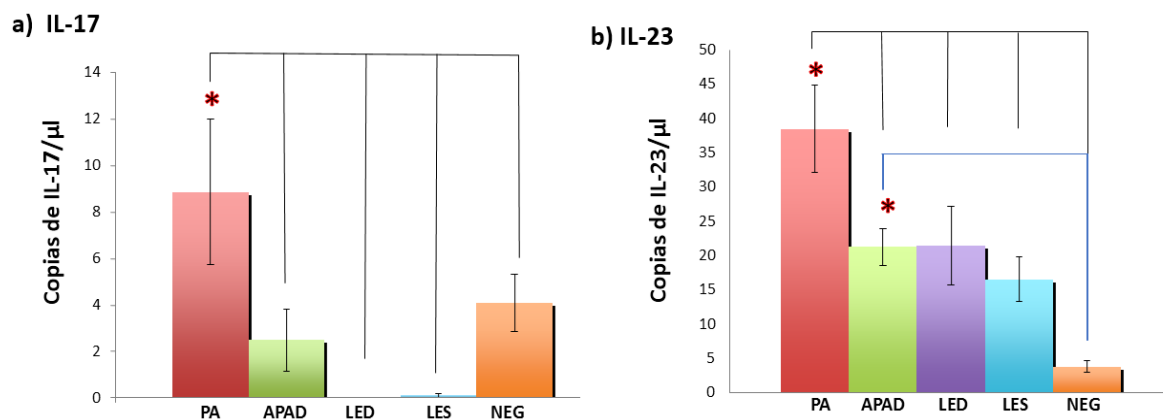


Figura 12. Promedio de la expresión de IL-17 e IL-23 en las muestras de Pustulosis Amicrobiana (PA), Pustulosis Asociada con Enfermedades Autoinmunes (APAD), Lupus Eritematosos Discoide (LED), Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y los controles negativos (NEG). * $p < 0.05$

En cuanto a la quimiocina (CXCL9) se encontró que su expresión es alta en los pacientes con pustulosis, LES, LED y APAD y con diferencias significativas con respecto a los controles negativos, siendo el grupo de pustulosis y APAD los que muestran mayor expresión de dicha citocina (Figura 13)

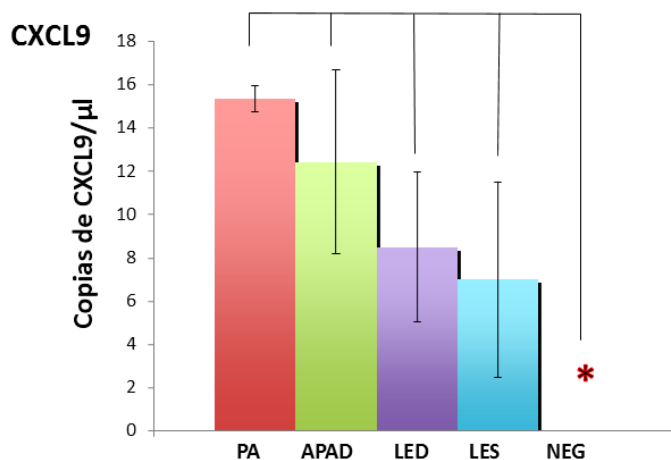


Figura 13. Promedio de la expresión de la quimiocina CXCL9 en Pustulosis Amicrobiana (PA), Pustulosis Asociada con Enfermedades Autoinmunes (APAD), Lupus Eritematosos Discoide (LED), Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y los controles negativos (NEG). * $p < 0.05$

Al analizar IL-18 se observa mayor expresión en el grupo de los APAD con respecto a las otras tres enfermedades, sin embargo no existen diferencias significativas, y los controles negativos, no la expresaron, pero tampoco se mostró una diferencia significativa con respecto a los grupos de enfermos (Figura 14a). Para TNF- α se presenta una expresión elevada en el grupos de pustulosis; LED y APAD, siendo en estos hasta 2.5 veces mayor con respecto a los pacientes con LES, pero no existen diferencias significativas, y como se esperaba el grupo control muestra una expresión baja de dicha citocina, aunque nada significativo con respecto a los demás grupos (Figura 14b). En cuanto a IFN- α se presenta una mayor expresión en el grupo de los LES con respecto a los demás, sin embargo no existen diferencias significativas (Figura 14c).

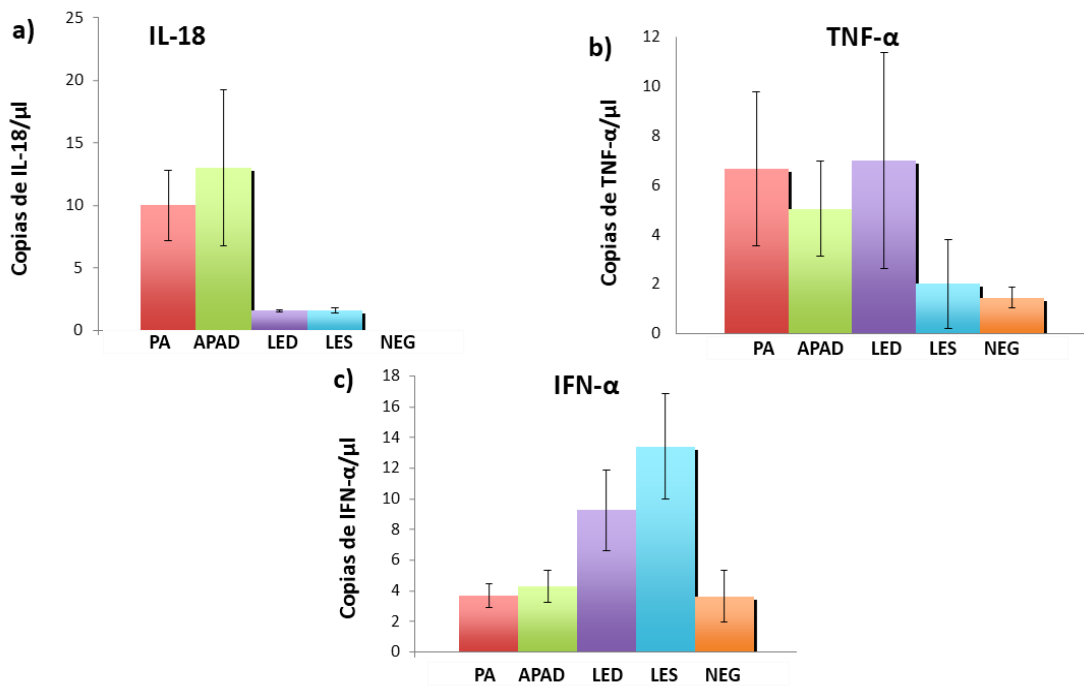


Figura 14. Promedio de la expresión de citocinas: a) Interleucina-18, b) Factor de Necrosis tumoral alfa, c) Interferón alfa, en Pustulosis Amicrobiana (PA), Pustulosis Asociada con Enfermedades Autoinmunes (APAD), Lupus Eritematosos Discoide (LED), Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y los controles negativos (NEG).

FOXP3 al estar presente con una citocina pro-inflamatoria como IL-17 su función se inhibe, por lo tanto observamos que en los grupos donde los niveles de expresión de IL-17 son altos los de FOXP3 son bajos, y en los grupos donde IL-17 son bajos los de FOXP3 son altos. (Figura 15)

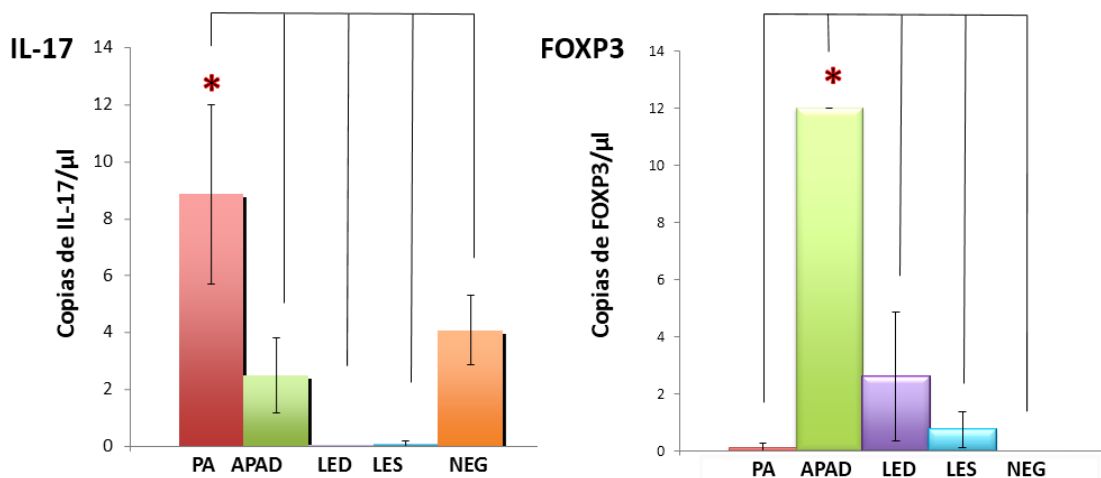


Figura 15. Promedio de la expresión de Interleucina-17 y el Factor de Transcripción intronuclear Forkhead box P3 (FoxP3) en las muestras de Pustulosis Amicrobiana (PA), Pustulosis Asociada con Enfermedades Autoinmunes (APAD), Lupus Eritematosos Discoide (LED), Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y los controles negativos (NEG). *p<0.05

Se esperaba que en el grupo de los controles negativos la expresión de citocinas fuera baja o nula, sin embargo en caso particular de Il-17 no fue como se esperaba (Figura 11a), por lo que se realizó una tinción con mieloperoxidasa (Ver anexo) para la búsqueda de neutrófilos, responsables de la síntesis de dicha citocina.

Después de realizar la inmunohistoquímica para mieloperoxidasa (Figura 15), se hizo un conteo de neutrófilos en cada laminilla. Como se muestra en la tabla se encontró que la mitad del tejido se hallaba invadido por dichas células en la epidermis y en la dermis, lo que significa que había un proceso inflamatorio en el momento que la muestra fue tomada.

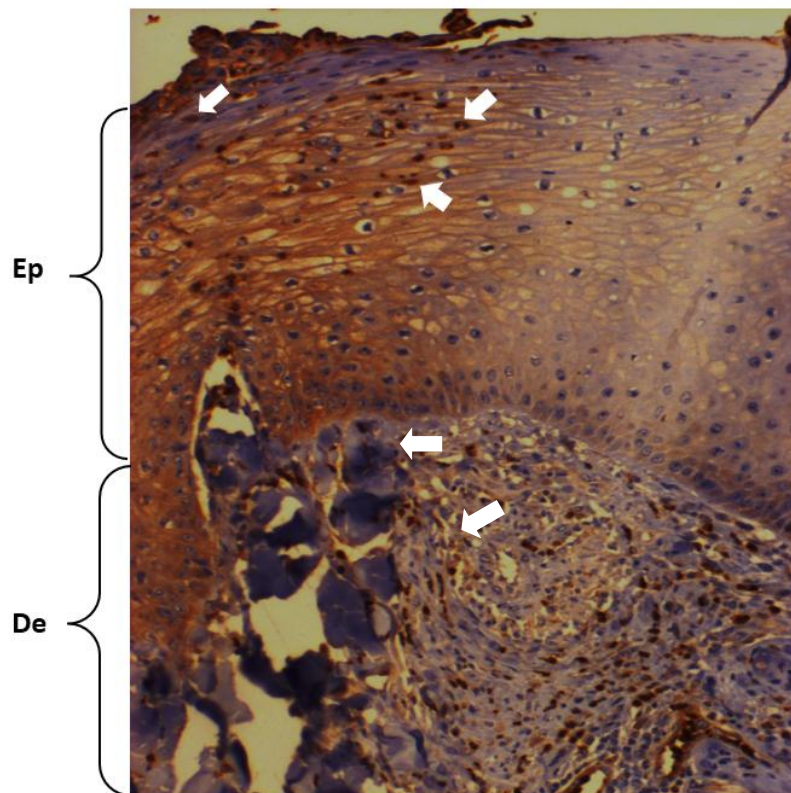


Figura 15. Corte de 3µm de piel humana, tinción mieloperoxidasa, 100x. En la imagen se observan neutrófilos teñidos de café (señalados con flechas blancas) en la epidermis (Ep) así como también en la parte que corresponde a la dermis (De).

Tabla 3. Promedio de neutrófilos en los controles negativos.	
Laminilla	Promedio (células)
Control 1	49,73
Control 2	53,58
Control 3	45,83
Control 4	55,55
Control 5	59,5

Es importante mencionar que sólo se obtuvo una muestra de Pénfigo Foliáceo mientras que de los demás se obtuvieron: 5 con pustulosis, 7 con APAD, 3 con LES, 3 con LED y 5 de piel sana. Al realizar los análisis con la muestra de pénfigo se observó un aumento en la expresión de todas las citocinas estudiadas con respecto a los demás grupos, pero no podemos considerar dichos resultados como valores significativos, para ellos se tendría que evaluar con mayor cantidad de muestras (Estos resultados no se muestran).

Comparación de la expresión de las citocinas en cada uno de los grupos estudiados.					
	PA (5)	APAD (7)	LED (3)	LES (3)	NEG (5)
IL-17	***	*	-----	-----	**
IL-18	**	***	*	*	-----
IL-23	***	**	**	**	*
CXCL9	***	**	**	**	-----
IFN-α	*	*	**	***	*
TNF-α	**	**	**	*	*
FOXP3	----	***	*	*	-----

Tabla 4. Se muestra una comparación de la expresión de citocinas entre cada una de las patologías estudiadas. Pustulosis Amicrobiana (PA), Pustulosis Asociada con enfermedades Autoinmunes (APAD), Lupus Eritematosos Discoide (LED), Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y controles negativos (CNEG)

*** Expresión alta; ** Expresión intermedia; * Expresión baja; ----- Expresión no detectada

DISCUSIÓN

Cada vez hay más evidencias de que las citocinas y las quimiocinas son actores importantes en la patogénesis de la pustulosis, así como en otras enfermedades autoinmunes como LES. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos observar que la producción de estas moléculas difiere para cada una de las patologías estudiadas.

– Pustulosis Amicrobiana

Una de las citocinas con mayor expresión en las muestras de pustulosis amicrobiana fue la IL-17 la cual es producto de las células Th17 y neutrófilos. IL-17 estimula la producción de quimiocinas como CXCL9 (Urra, 2012), debido a ello se muestra una síntesis elevada de esta quimiocina en este grupo de pacientes.

CXCL9 estimula la desgranulación de los neutrófilos para liberar radicales de oxígeno reactivos, induciendo la respuesta inflamatoria (Shui- LianYu, 2012), por lo cual se mantiene constantemente el proceso inflamatorio en los pacientes

Para la diferenciación y proliferación de células Th17 es indispensable la síntesis de IL-23 que es producida por células mieloides (Davies, 2001), por lo tanto IL-23 estimula la producción de IL-17 (Lombardi, 2007), lo cual se ve relacionado con nuestros resultados donde observamos que los pacientes con pustulosis presentan altos niveles de IL-23 y de IL-17 (Tabla 4).

TNF- α e IL-18 también se encuentran relacionados con la producción de CXCL9. TNF- α permite la acumulación de quimiocinas como CXCL9, para atraer más células inflamatorias como los macrófagos y neutrófilos (Nabatian, 2012). En el caso de IL-18 ocurre de la misma manera, permite la síntesis de quimiocinas y promueve la diferenciación de las células a TH1 (Lourenco, 2013), para producir más citocinas proinflamatorias.

En los pacientes con pustulosis se muestra una baja expresión de IFN- α y FOXP3, para ambos casos se debe a la alta expresión de IL-17 que inhibe la síntesis de dichas citocinas. Nuestros resultados con respecto a IFN- α son similares con los resultados obtenidos por S. H. Oh y colaboradores donde los pacientes con altos

niveles de IL-17 muestran bajos niveles de IFN- α , donde concluyen que los interferones de tipo I como IFN- α bloquean la síntesis de IL-17 e IL-23, y viceversa. En cuanto al factor de transcripción se sabe que en presencia de una citocina proinflamatoria como IL-17 su actividad se ve disminuida. (Ziegler, 2009)

– Pustulosis Amicrobiana Asociada con Enfermedades Autoinmunes

En el grupo de los pacientes con APAD observamos que los niveles de IL-17 son bajos debido a la expresión de FOXP3, sin embargo la expresión de éste no se muestra significativamente alta debido a la producción de otras citocinas proinflamatorias como IL-23, que reprimen su expresión. (Ziegler, 2009)

En este grupo de pacientes se muestra mucho más elevada la síntesis de IL-18 con respecto a los demás grupos (Tabla 4), la presencia de esta citocina y de TNF- α permiten la síntesis de CXCL9, por lo que observamos una relación en los niveles de expresión de la quimiocina con respecto a los niveles de TNF- α e IL-18. En cuanto a la expresión de IFN- α en los pacientes con APAD los resultados muestran que es baja, posiblemente se deba a la poca expresión de IL-17 que provoca la disminución del interferón. (Oh, 2011)

– Lupus Eritematoso Discoide

Los pacientes con LED no expresaron IL-17, esto se debe a la síntesis de FOXP3 que como se mencionó anteriormente inhibe la producción de dicha citocina y a pesar de estar presente IL-23 para contrarrestar el efecto del factor de transcripción, no es suficiente debido a la presencia de IFN- α que se encuentra con niveles más altos que en las dos enfermedades anteriormente mencionadas. Por lo tanto la actividad de FOXP3 y de IFN- α conjuntamente inhibe la síntesis de IL-17.

La expresión de IL-18 se ve disminuida en este grupo, sin embargo la de CXCL9 no lo es, debido a que el TNF- α por sí sólo es capaz de inducir la síntesis de dicha quimiocina, pero además TNF- α contribuye a la producción de IFN- α por las células dendríticas plasmáticas (pDC) (Lourenco, 2013), y esta citocina a su vez estimula la producción de quimiocinas como CXCL9, teniendo dos fuentes para la

producción de CXCL9 sin la presencia de IL-18, para el reclutamiento de células T autorreactivas, de macrófagos y neutrófilos para mantener la respuesta inflamatoria en la piel. (Johnson- Huang, 2009) Como podemos ver varias citocinas inducen los mismos efectos biológicos.

– Lupus Eritematoso Sistémico

En el análisis de los pacientes con LES se observa una expresión más elevada de IFN- α con respecto a los demás grupos analizados (Tabla 4) por lo tanto se ve que la expresión de IL-17 es nula, por la actividad de IFN- α conjuntamente con la actividad de FOXP3.

En este grupo de pacientes se ve una expresión baja de TNF- α e IL-18 con respecto a los demás grupos, lo cual se ve relacionado al tratarse de una enfermedad sistémica con respecto a aquellas patologías órgano específico. Por lo contrario IFN- α se observa elevado con enfermedades sistémicas de aquellos grupos con enfermedad localizada.

La producción de IFN- α contribuye a la amplificación de la inflamación induciendo la síntesis de CXCL9 (Urra, 2012), que es importante para el reclutamiento de células inmunes. A pesar de que IL-18 y TNF- α se encuentren bajas, INF- α es capaz de mantener los niveles altos de la quimiocina.

– Controles negativos

Para el caso de los controles negativos la producción de las citocinas, a excepción de IL-17, es baja, debido a que no hay ningún estímulo (infección, enfermedad o lesión en la piel) que conlleve al reclutamiento y activación de las células inmunes para la producción de citocinas.

IL-17 es sintetizada por células T, eosinófilos, monocitos y neutrófilos, estos últimos son la primera línea de defensa, por lo cual son los primeros en reclutarse en el sitio de inflamación, teniendo esto en cuenta se realizó la tinción de mieloperoxidasa, que es una tinción específica para las células polimorfonucleares. Como se observa en la Figura 13 tanto la epidermis como la

dermis se encontraban invadida de neutrófilos, debido a esto es que IL-17 se muestra elevada en el grupo de controles.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos inferir que los pacientes utilizados como controles negativos en el momento de la biopsia presentaba un proceso inflamatorio no reportado, pudieron estar inmunocomprometidos o incluso presentar una enfermedad distinta a las estudiadas.

Se esperaba que en este grupo se mostrará una expresión del factor de transcripción FOXP3 ya que es uno de los marcadores específicos de las células Treg, que como es bien sabido su función principal es mantener la tolerancia inmunológica periférica al presentar células T autorreactivas que han escapado del timo (D' Arena, 2012; Solomon, 2008). Sin embargo, no fue así debido a la expresión de IL-17 que como se ha mencionado anteriormente inhibe la actividad de FOXP3.

Los resultados obtenidos de manera general con respecto a LES y LED se ven relacionados con los resultados que presentan otros investigadores como Stein y Toro con experimento similares donde encuentran aumento significativo para IFN y otras citocinas que aunque no fueron evaluadas en este estudio contribuyen a la síntesis de las citocinas estudiadas como es el caso de IL-6 que es importante para la diferenciación de células Th17. (Ziegler, 2009)

En enfermedades órgano específico como LED y APAD se ve elevada la expresión de IL-18 y TNF- α , que permiten la síntesis de otras citocinas para reclutar a más células en el sitio de inflamación; mientras que en las enfermedades sistémicas como es el caso del LES hay una expresión elevada de INF- α con respecto a las demás citocinas, debido a que interferón permite el reclutamiento de otras células para la producción de citocinas en el sitio de inflamación.

Como fue mencionado en la introducción la pustulosis amicrobiana es una entidad nueva y poco se sabe de ella, por lo que nuestro estudio contribuye al

entendimiento de la enfermedad, y como podemos observar en los resultados en esta patología se ve una respuesta TH17 muy marcada.

CONCLUSIONES

Los análisis realizados en este proyecto aportan información importante para la caracterización de cada una de las patologías estudiadas, nos permitieron mostrar que el uso de las citocinas como marcadores es una herramienta útil en los estudios moleculares.

La técnica de qPCR resultó ser una buena herramienta para este tipo de análisis y podría sumarse a los exámenes de laboratorio e histopatológicos que se realizan actualmente en nuestro país con respecto a las enfermedades estudiadas.

La expresión exacerbada de la IL-17 en pacientes con pústulosis amicrobiana permite concluir que esta enfermedad se encuentra dominada por una respuesta inflamatoria Th17; mientras que las otras enfermedades muestran una respuesta inflamatoria Th1.

PERSPECTIVAS

Recolectar una mayor cantidad de bloques embebidos en parafina de pacientes que presenten alguna de las patologías analizadas para que nuevamente se evalúe la expresión de las mismas citocinas, observar su patrón de expresión y compararlo con el patrón que se obtuvo con las muestras recolectadas para este proyecto.

Evaluar la expresión de citocinas de tejido en fresco para observar si es similar a la expresión de las muestras de tejido embebido en parafina, y con ellos ver si la cantidad y el método con el que se procesa las muestras influyen con la expresión de dichas proteínas.

Analizar la expresión de otras citocinas como IL-1, IL-5, IL-6, TGF- β , CXCL10, IL-12, INF- γ , que se ha reportado que sus niveles de expresión son altos para algunas patologías como en el LES.

La muestra que se recolectó de pénfigo permitió observar el patrón de expresión de las citocinas analizadas, sin embargo al ser un sólo caso no puede considerarse como un valor significativo por lo cual la recolección de más casos serviría para realizar nuevamente el análisis y poder tener datos más concisos y concluir de manera precisa.

REFERENCIAS

- Alunno, A. et al. (2012). Balance between Regulatory T and Th17 Cell in Systemic Lupus Erythematosus: The Old and the New. *Clinical and Developmental Immunology*, 1-5 .
- Antille, C. et al. (2008). Amicrobial pustulosis of the folds associated with autoimmune disorders. A case report with an analysis of cytokine expression profile in skin lesions of cutaneous neutrophilic lupus. *Dermatology*, 324-329.
- Balnescu, P. et al. (2010). T Helper 17 Cell Population in Lupus Erythematosus. *Intern Med*, 255-259 .
- Barros, C. et al. (2011). Citocinas y Dolor. *Brasileira de Anestesiología*, 137- 142 .
- Bielsa, I. & Rodríguez M. (2010). Manifestaciones cutáneas del lupus eritematoso. *Inmunología*, 100- 110 .
- Cañas, C. (2011). Autoinmunidad y autoinflamación. *Acta Médica Comlombiana*, 78- 84 .
- Carneiro, J. et al. (2011). IL-2, IL-5, TNF- α and IFN- γ mRNA expression in epidermal keratinocytes of systemic lupus erythematosus skin lesions. *Clinics*, 77- 82 .
- Connolly, J. et al. (2012). Role of Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus: Recent Progress from GWAS and Sequencing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1- 17 .
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* , 299- 305.
- D' Arena, G. et al. (2012). Regulatory T-cells in Chronic Lymphocytic Leukemia and Autoimmune Diseases. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 1- 7 .
- Davies, D. (2001). Immune System. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1- 8 .

- Davis, L. et al. (2011). The role of Cytokines in the Pathogenesis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Interferon & Cytokine research*, 781- 786 .
- De Pablo, R. et al. (2005). Balance entre citocinas pro y antiinflamatorias en estados sépticos. *Med. Intensiva*, 151- 158 .
- Enríquez, M. (2013). Fisiopatología del lupus eritematoso sistémico. *Revista de Medicina e Investigación*, 8- 16 .
- Espinosa, L. (2014, Enero 16). *Guía Práctica sobre la Técnica de PCR*. Retrieved from <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>
- Gambichler, T. et al. (2007). Immunohistology of amicrobial pustulosis of the folds. *Clin Ex Dermatol*, 155- 158.
- Gambichler, T. et al. (2012). Cytokine and chemokine ligand expression in cutaneous lupus erythematosus. *Eur J Dermatol*, 319- 323 .
- Giansante, E. & Pérez, R. (2013, Noviembre 15). *Espectro cutáneo de Lupus Eritematoso*. Retrieved from <http://piel-l.org/libreria/item/878>
- Giraldo, C. et al. (2009). Psoriasis: revisión del tema con énfasis en la inmunopatogénesis. *Latreia*, 272- 283 . Retrieved from 272- 283 pp
- Johnson- Huang, L. et al. (2009). Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. *J Clin Immunol*, 247- 256 .
- Kaplan, M. (2011). Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol*, 691- 699 .
- Kindt, T. et al. (2007). *Inmunología de Kuby*. México: Mc Graw Hill.
- Ko CJ, e. at al. (2011). Hypertrophic Lupus erythematosus: the diagnostic utility of CD123 staining. *Departament of Patology, Yale University School of Medicine*, 889- 892 .

- Lim, Y. et al. (2012). Amicrobial pustulosis associated with autoimmune disease in a patient with Sjögren syndrome and IgA nephropathy. *Clinical and Experimental Dermatology*, 374- 378 .
- Lombardi, B. et al. (2007). The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 32- 46 .
- Lourenco, E. & La Cava, A. (2013). Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. *NIH Public Access Author Manuscript*, 242- 254 .
- Luque, J. & Herráez, A. (2011). *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. Barcelona: Elsevier.
- Magged, R. & Prud'homme, G. (2003). Immunopathology and the gene therapy of lupus. *Gene Therapy*, 861- 874.
- Manukyan, G. et al. (2010). Comparative analysis of cytokinein autoinflammatory and profiles autoimmune conditions. *Cytocine*, 146- 151.
- Marcano, M. et al. (2014, Enero 14). *Factores asociados con la respuesta inmunológica en el lupus cutáneo*. Retrieved from http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_2523.pdf
- Márquez, B. et al. (2009). Pustulosisamicrobiana de las flexuras. Descripción de un nuevo caso y revisión de la literatura. *Actas Dermosifiliorg*, 710- 714 .
- Marzano, A. et al. (2011). Inflammatory cells, cytokines and matrix metalloproteinases in amicrobial pustulosis of the fold and other neutrophilic dermatoses. *nt J Immunpathol Pharmacol*, 451- 460 .
- Méndez, E. (2009). *Tesis: caracterización fenotípica y funcional de células dendríticas en Lupus Discoide*. México : Instituto Politécnico Nacional.

- Nabatian, A. et al. (2012). Tumor necrosis factor release in peripheral blood mononuclear cells of cutaneous lupus and dermatomyositis patients. *Arthritis Research & Therapy*, 1- 11 .
- Navarrete, G. (2003). *Histología de la Piel*. México : Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina.
- Oh, S. H. et al. (2011). Expression of interleukin-17 is correlated with interferon- α expression in cutaneous lesions of lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Dermatology*, 512- 520 .
- Promega. (2014, Enero 16). *Reverse Transcription System*. Retrieved from <https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/reverse%20transcription%20system%20protocol%20tb099.pdf>
- Promega. (2014, Enero 16). *Technical Manual. ReliaPrepTMFFPE Total RNA Miniprep System. Instructions for use if products Z1001 and Z1002*. Retrieved from <https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/101/reliaprep%20ffpe%20total%20rna%20miniprep%20system%20protocol.pdf>
- Ríos, J. & Ríos, M. (2010). Inmunogenética de la psoriasis y de la artritis psoriásica. *Revista Médico Científica*, 32- 39 .
- Roitt, I. (2008). *Roitt Inmunología: Fundamentos*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Romero, T. García, E. & Leal, J. (2009). Citocinas y Lupus Eritematoso Sistémico. *Gaceta Médica de Caracas*, 196- 211 .
- Sacre, K. et al. (2012). Hydroxychloroquine is associated with impaired interferon- α and tumor necrosis factor- α production by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 1- 10 .
- Saint- Jean, M. et al. (2010). Amicrobialpustulosis of the skin folds and autoimmune erythroblastopenia. *Ann Dermatol Venereol*, 399-404.

- Salomón, M. et al. (2009). Manifestaciones histopatológicas del lupus eritematoso cutáneo en pacientes del Servicio de Dermatología del Hospital Nacional Cayetano Heredia. *Folia Dermatol*, 64- 70.
- Sánchez, S. et al. (2004). Lupus eritematoso: enfermedad autoinmune sistémica o órgano específica. *Rev. Biomed*, 173- 180 .
- Shachar, I. & Karin, N. (2012). The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *Journal of Leukocyte Biology*, 1- 11.
- Shui- LianYu, et al. (2012). Immunopathological roles of Cytokines, Chemokines, Signaling Molecules, and Pattern- Recognition Receptors in Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical and Developmental Immunology*, 1- 14.
- Solomon, G. & Magro, C. (2008). FoxP3 expression in cutaneous T-cell lymphocytic infiltrates. *Journal of Cutaneous Pathology*, 1032- 1039.
- Somma, M. & Querci, M. (2014, Diciembre 20). *Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. Retrieved from <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n4.pdf>
- Sontheimer, R. (1997). The lesion of cutaneous lupus erythematosus- a review and personal perspective on the nomenclature and classification of the cutaneous manifestations of lupus erythematosus. *Lupus*, 84- 95.
- Tamay, L. et al. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud. Investigación en Discapacidad*, 70- 78.
- Urra, J. & De la Torre, M. (2012). Cytokines and Systemic Lupus Erythematosus. *ISBN*, 1- 15.
- Uva, L. et al. (2012). Cutaneous Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Diseases*, 1- 15.

- Valencia, O. & Velázquez, M. (2011). Inmunopatogenia del pénfigo vulgar y el pénfigo foliáceo. *Latreia*, 272- 286.
- Vera, C. (2011). Manifestaciones Especificas del Lupus Cutáneo. *Rev. Chil. Reumatol*, 222- 228.
- Waite, J. & Skokos, D. (2011). Th17 Response and Inflammatory Autoimmune Diseases. *International Journal of Inflammation*, 1- 10 .
- Welsch, U. (2008). Piel . In U. Welsch, *Histología* (pp. 548-568). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Wenzel, J. et al. (2007). The expression pattern of interferon- inducible proteins reflects the characteristic histological distribution on infiltrating immune cells in different cutaneous lupus erythematosus subsets. *Epub*, 752- 757 .
- Ziegler, S. & Buckner, J. (2009). FOXP3 and the Regulation of Treg/Th17 Differentiation. *NIH Public Access. Author Manuscript*, 594-598.

ANEXOS

Electroforesis

Gel de agarosa 1.8%

Se pesaron 1.8 g de agarosa los cuales fueron colocados en un matraz Erlenmeyer junto con 100 ml de TAE 1x. El matraz se calentó en un horno de microondas hasta que la agarosa quedara totalmente disuelta. Se dejó enfriar la mezcla y se le añadieron 6µl de SYBR Green, se vertió en el molde de geles y se colocó el peine. Una vez solidificado se retiró el peine procurando no deformar o romper alguno de los pozos.

Buffer de corrida (TAE 10x)

Para la preparación de 1 litro de TAE 10x con pH 8.0 se pesaron 48.8 g de Tris-Base, se colocaron en un vaso de precipitado y se le añadieron 11.4 mL de ácido acético y 20 ml de EDTA (0.5mM). Con un potenciómetro se midió el pH y de ser necesario se ajustó hasta obtener un pH= 8.0

Para preparar 250mL de la solución de EDTA (0.5mM) a partir de EDTA 500mM se pesaron 46.525 g, colocándolos en un vaso de precipitado y se disolvió en 250 mL de agua destilada.

Para utilizar el TAE en la electroforesis se necesita a una concentración de 1x por lo tanto se tomaron 100 ml de TAE 10x, se colocan en una probeta y se afora con agua destilada a 1000 ml.

Buffer de carga 6x

Para la preparación del Buffer mixto 6x (azul de bromofenol y azul xilenocianol se realizó lo siguiente:

Se pesaron 25 mg de azul bromofenol, 25 mg de azul xilenocianol, se midieron 3 ml de glicerol y se aforó a 10 mL con agua desionizada.

Tinción para neutrófilos

Inmunohitoquímica (con anti-mieloperoxidasa)

Se realizaron cortes de 5 μm de los bloques de parafina de los controles negativos y fueron colocados en portaobjetos, los cuales se dejaron durante 30 min en la estufa a 60°C. Una vez transcurrido el tiempo se depositaron en una canastilla para ser sumergidos en xilol absoluto por 5 min, después se dieron 10 lavados en cada una de las siguientes soluciones: xilol absoluto 2, etanol- xilol, etanol 96% 1, etanol 96% 2 y finalmente agua.

Se trasladó cada uno de los portaobjetos a un vaso coplin con EDTA 0.5M, el cual fue colocado en la olla de recuperación por 20 min (en este paso es donde se hace la recuperación antigénica). Ya que pasaron los 20 min se deja atemperar el vaso coplin para posteriormente colocar los portaobjetos en el capilar, al terminar el montaje en el capilar se lava con buffer por 2 min.

Después se bloqueó la peroxidasa con el bloqueador universal (2 gotas) por 5 min a temperatura ambiente, se lavó con el buffer por 2min y se adicionaron 100ul del anticuerpo (mieloperoxidasa) dejando reposar 30 min. Se lavó con buffer por 2 min y se añadieron 2 gotas de la biotina (solución amarilla) marca Bio-care Medical, USA, e incubó por 10 min a temperatura ambiente, volviendo a lavar por 2 min con el buffer, enseguida se agregó el HRP solución (roja) Bio-care Medical, USA, e incubó 10 min a temperatura ambiente y, nuevamente se enjuago con buffer por 2 min.

Por último se desmontaron los portaobjetos del capilar y se pasaron a una canastilla, que se coloca en una solución de DAB (3,3'-diaminobencidina). Una vez que se observó una tonalidad marrón se lavó con agua y se contrastó con hematoxilina, se enjuago con agua y se trasladaron a lavados en agua amoniacal, nuevamente se enjuago con agua, para pasarlos al tren de deshidratación (lavados en etanol 96% 2, etanol 96% 1, etanol absoluto 2. etanol absoluto, etanol-xilol y finalmente xilol absoluto, para después montar con resina y cubreobjetos.