



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

CAMPO DE CONOCIMIENTO: CIENCIAS MÉDICAS

Título de Tesis:

**CONTRIBUCIÓN DE LAS CITOCINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE
LUPUS ERITEMATOSO CUTÁNEO**

Modalidad de Graduación: TESIS

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS**

P R E S E N T A

Dra. Silvia Méndez Flores

TUTORES

Dra. Gabriela Hernández Molina

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas

México D.F. Junio 2015



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.

**DRA. SILVIA MÉNDEZ FLORES
ALUMNO DE MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRÁN**

**DRA. GABRIELA AURORA HERNÁNDEZ MOLINA
TUTOR DE TESIS
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRÁN**

**DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS
RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA
CAMPO DE CONOCIMIENTO CIENCIAS MÉDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	7
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVOS.....	8
METODOLOGÍA.....	9
- Diseño del estudio	9
- Población de estudio	9
- Procedimientos Laboratorio.....	11
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	14
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES.....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
TABLAS.....	53
ANEXOS.....	61
- Anexo 1. Índice de severidad y área de lupus cutáneo (CLASI).....	61
- Anexo 2. Microfotografías de Inmunohistoquímica.....	62
- Anexo 3. Fotografías Clínicas.....	70

I. RESUMEN

-

Título: Contribución de citocinas y células reguladoras en la fisiopatología de Lupus Eritematoso Cutáneo

Introducción: El Lupus eritematoso cutáneo (LEC) es una enfermedad con una amplia gama de manifestaciones cutáneas que afectan la calidad de vida. Su patogénesis es compleja y en ella pudieran participar diversas citocinas.

Objetivo: Evaluar de forma integral la participación citocinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias dentro de las que se encuentran IL-10, IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-22 , así como células reguladoras Tregs, Bregs y pDCregs circulantes y en piel de pacientes con LEC.

Métodos: Se obtuvo sangre periférica y biopsia de piel afectada de 20 pacientes con lupus eritematoso cutáneo discoide (LED), 15 pacientes con lupus eritematoso cutáneo subagudo (LECS), 16 controles sanos y 5 pacientes con cicatriz hipertrófica (CH). Los tejidos fueron examinados mediante inmunohistoquímica con técnica de inmunoperoxidasa indirecta y procedimiento de doble tinción, para determinar células Th22, Th17, Th1, Th4, Tregs, Bregs y pDCregs. La inmunofenotipificación de las células circulantes, se realizó mediante citometría de flujo, los niveles séricos de IL-22, IL-17A e IL-10 fueron medidos por ELISA.

Resultados: Nuestros resultados mostraron primordialmente participación celular de Th17, Th22 y células pDCregs, y en menor grado de Th1, Th2 y células T regs en los grupos de LEC (LED y LECS); siendo esta respuesta de mayor intensidad en LED.

Conclusiones: La respuesta inflamatoria en el LEC está mediada principalmente por la población celular de Th17, mientras que en un intento de alcanzar la homeostasis participan las poblaciones Th22 y pDCregs. Esta respuesta se observó en ambos subtipos de LEC, pero fue de mayor amplitud en la variedad discoide (LED).

II. ANTECEDENTES

=

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune sistémica que cursa con periodos de remisiones y exacerbaciones, origina daño mediado por diversos mecanismos inmunológicos en diferentes aparatos y sistemas. Esta entidad afecta varios órganos como la piel, articulaciones, células sanguíneas, riñones y sistema nervioso, por lo que su expresión clínica es amplia y variable. La desregulación del sistema inmune, involucra factores hereditarios, ambientales, hormonales, etc., que interactúan en el desarrollo de LEG. Sin embargo, hasta el momento los factores que contribuyen a su inicio y progresión no son bien comprendidos. Por ejemplo, se han determinado algunas aberraciones funcionales en las células T, B y presentadoras de antígeno y defectos en la depuración de células apoptóticas.

La afección de la piel ocurre en el 70-85% de los pacientes con LEG en algún momento durante el curso de la enfermedad y es la segunda forma clínica de presentación inicial del LEG (1).

El lupus eritematoso cutáneo (LEC) es una enfermedad crónica inflamatoria autoinmune con manifestaciones clínicas heterogéneas confinadas a la piel; por lo tanto, incluye los síntomas que se observan en la piel del LEG y al lupus cutáneo-limitado cuya incidencia se ha estimado dos a tres veces mayor a la del LEG. El LEC puede preceder clínicamente al LEG en aproximadamente el 25% de los pacientes, o bien puede ocurrir en cualquier etapa durante el seguimiento del LEG (2).

En 1977, basándose en el análisis histológico de las biopsias de piel, Gilliam propuso un sistema de clasificación de LEC el cual dividió a la gran variedad de lesiones en manifestaciones específicas (LEC-especifico) y no específicas (LEC-no específicas). Se consideran lesiones específicas a aquellas en las que se evidencian cambios histopatológicos característicos como son la presencia de “dermatitis de interfase”, depósito de mucina en la dermis superficial e infiltrado inflamatorio predominantemente linfocitario perianexial y perivascular. Estas manifestaciones son exclusivas de pacientes con lupus y no se observan en otras colagenopatías (3).

Por otra parte, las lesiones no específicas no son exclusivas del LEG y pueden observarse en otras colagenopatías. Dentro de este grupo se encuentran: la alopecia no cicatrizal, úlceras, urticaria, eritema multiforme, vasculitis, fenómeno de

Raynaud, atrofia blanca, anormalidades del pigmento, lesiones bulosas, telangiectasias periungueales y calcinosis cutis (4).

A su vez, las lesiones específicas se subdividen en tres categorías de acuerdo a sus características clínicas: lupus eritematoso cutáneo agudo (LECA), lupus eritematoso cutáneo subagudo (LECS) y lupus eritematoso cutáneo crónico (LECC). El LECA se asocia a menudo con LEG activo y se manifiesta como eritema malar. El LECS representa el 10-15% de los casos de LEC, se compone de diversas variantes morfológicas dentro de las cuales predominan el LECS anular y el LECS papuloescamoso, variedad asociada a la presencia de anticuerpos anti-Ro/SSA. El LECC, incluye a la variedad discoide (LED), al lupus sabañón, a la paniculitis lúpica y al lupus túmido; el LED es el subtipo más común de LEC, el cual se presenta como placas constituidas por eritema, hiperpigmentación, escama gruesa adherida y en etapas tardías zonas de atrofia, que usualmente se localizan en cabeza, pero puede diseminarse al tórax y los brazos (4).

Como se mencionó previamente, las manifestaciones del LEC son heterogéneas y frecuentemente representan un reto clínico, lo cual a su vez refleja la complejidad de los mecanismos patogénicos subyacentes.

En cuanto a la patogenia del lupus cutáneo inicialmente se propuso un modelo de cuatro pasos: a) la exposición a luz ultravioleta induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios epidérmicos y dérmicos como la IL-1 y el TNF- α ; b) estos mediadores inducen la liberación y expresión de moléculas de adhesión y la translocación de autoantígenos normalmente intracelulares como Ro/SSA, c) la producción de autoanticuerpos que se unen a estos autoantígenos y d) la citotoxicidad del queratinocito como el resultado de las células linfoides reclutadas de la circulación (5). Sin embargo, desde que se propuso este modelo, se ha generado una gran cantidad de información en relación a la fisiopatogenia de la enfermedad. Por ejemplo el papel de la apoptosis del queratinocito, las anormalidades genéticas en la síntesis y expresión del TNF- α y en los antagonistas del receptor para la IL-1 y la interacción de quimiocinas y diversas citocinas tanto pro-inflamatorias como inmunomoduladoras (5). En las lesiones del LEC se ha evidenciado que el infiltrado inflamatorio predominantemente es por linfocitos T CD4⁺ así como células dendríticas (6).

Las citocinas, glicoproteínas solubles de un peso molecular menor a 30 kDa, producidas principalmente por las células nucleadas del organismo, las cuales

mediante varias respuestas biológicas, incluyendo la inmunidad innata y adaptativa, juegan un papel importante en la diferenciación, maduración y activación de las células de los órganos y los tejidos del sistema inmune; además de inducir de manera directa e indirecta la inflamación tisular.

Investigaciones recientes han revelado que la susceptibilidad para desarrollar el LEG depende en gran medida de algunos genes de citocinas y de aquellos que regulan la expresión de las mismas. Se ha descrito que el perfil de citocinas asociado a la patogénesis del LEG incluye a la IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN-I y TNF- α (6); – por lo que se han considerado como blancos terapéuticos.

No obstante, el patrón de citocinas en las manifestaciones cutáneas ha sido menos estudiado. Algunos de los hallazgos se describen a continuación. Nürnberg y cols., examinaron la expresión del ARNm para la IL-6 en la epidermis de la piel afectada y no afectada de los pacientes con LECS y LED, observando un incremento de los mensajeros en los queratinocitos basales de la piel afectada (7). Por otro lado, Stein y cols., determinaron la expresión génica de la IL-5, IL-10, IL-2, IL-4 y del INF- γ en biopsias de pacientes con LECA, LECS y LED y la compararon con biopsias de individuos sanos, encontrando que los ARNm para IL-5 se expresaban en los pacientes con LEC independientemente del subtipo pero no en los individuos sanos, lo que sugería una respuesta Th2; sin embargo, el ARNm para la IL-4 no se detectó en ninguna muestra. Los mensajeros para la IL-10 y el INF- γ se expresaron tanto en las biopsias de los pacientes con LEC como en las de los individuos sanos (8). Toro y cols., evaluaron la expresión génica de la IL-2, IFN- γ , IL-4, TNF- α e IL-1 β y proteica de los receptores correspondientes. Los resultados mostraron un incremento en los ARNm para la IL-2, el IFN- γ y el TNF- α y un aumento del IL-2R, el IFN- γ R y el TNF- α R en la superficie de la células de la dermis de pacientes con LED (9), así como de TGF- β [6]. Así, el 47% de los pacientes evaluados presentaron sobreexpresión de al menos una citocina; siendo la IL-5 y el IFN- γ las más frecuentemente elevadas. Además, los pacientes con lesiones más extensas tuvieron una mayor sobreexpresión de citocinas (10) pero no hubo diferencias en cuando a la variedad clínica de LEC.

Asimismo, se ha reportado un incremento de IL-18. La IL-18 induce inflamación por medio del incremento en la síntesis de TNF- α y la disminución de IL-12, originando un microambiente pro-apoptótico para el queratinocito (11).

Con base en lo anterior, puede afirmarse que existe una alteración en el equilibrio Th1/Th2 en la patogénesis del LEC.

Recientemente se ha evaluado la participación de una subpoblación de células T productora de IL-17 (Th17) en el LEG, encontrando una correlación directa entre la actividad de la enfermedad y la concentración sérica de la citocina(12). Hasta el momento solo un estudio ha evaluado la participación de esta interleucina en biopsias de pacientes con LECS y LED; encontrándose un incremento en la expresión de IL-17A en las células endoteliales, los fibroblastos y los linfocitos de pacientes *versus* los controles. De igual forma los niveles séricos de IL-17A se encontraron incrementados en pacientes con LED pero no en la variedad de LECS, mientras que los niveles de IL-17F estuvieron aumentados en ambas variedades. Este resultado sugiere la participación de la IL-17 en la patogénesis del LEC (13).

Finalmente en cuanto a la participación de las células T reguladoras (Treg) un estudio reportó que éstas se encuentran disminuidas en el infiltrado inflamatorio de pacientes con LEC independientemente del subtipo de la lesión (14). La participación de las células B productoras de IL-10 y de las células dendríticas plasmacitoides se desconoce.

El presente trabajo de investigación pretende evaluar de forma integral la participación diversas citocinas tanto pro-inflamatorias como anti-pro-inflamatorias dentro de las que se encuentran IL-10, IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-22 en el LEC. También se evaluará la participación de células T reguladoras (CD4⁺/Foxp3, la participación de las células B productoras de IL-10 (Bregs) y de células dendríticas plasmacitoides reguladoras (CD123^{hi}/CD196⁺/IDO⁺). A continuación se describe brevemente cada una de las citocinas a evaluar:

- **IL-22.** Es producida por diversas fuentes celulares que incluyen a lasTh17, células NK y células Th22. Participa en la inmunidad de los epitelios, induce la producción de defensinas, la síntesis de proteínas antimicrobianas Reg IIIb y Reg IIIg, regula la preparación tisular, mantiene la homeostasis cutánea, etc. Recientemente ésta ha sido asociada a enfermedades autoinmunes y se ha sugerido que se encuentra involucrada en su patogénesis. Por ejemplo se ha descrito una disminución en los niveles séricos de la IL-22 en los pacientes con LEG, pero aún es controvertido si este hallazgo pudiera ser consecuencia del uso de esteroides sin considerar que aún no ha sido evaluada en lupus cutáneo.

- **IL-10.** Esta citocina es uno de los principales mediadores anti-inflamatorios producido por las células TCD4⁺, TCD8⁺, monocitos y células B autorreactivas (15). Su función supresora implica la inactivación de los macrófagos, células dendríticas y células Th1; además promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de células B.

En pacientes con LEG se ha reportado el incremento en los niveles séricos de IL-10, así como una correlación positiva con la actividad de la enfermedad (16-17).

- **IFN- γ .** Participa en la activación de macrófagos, en la eliminación de patógenos intracelulares, promueve la respuesta Th1 y modula la de células Tregs. Esta citocina es producida por células NK y por Th1. En algunos estudios se ha encontrado elevado en el suero de pacientes con LEG (18). Asimismo, se han documentado niveles elevados de ARNm en las lesiones cutáneas del lupus experimental en ratones *knockout* para el TNF- α . Sin embargo la evidencia de su participación en lupus cutáneo es aún insuficiente (19).

- **IL-4.** Es una citocina anti-inflamatoria, producida por las células Th2, que junto con la IL-13 inducen la diferenciación de los macrófagos residentes del tejido a la variante arginasa1⁺/STAT6⁺/IRF4⁺ que participan en la reparación y/o regeneración tisular, además de la estimulación de secreción de IL-10 y TGF- β , lo que disminuye la inflamación patológica mediada por células Th1. Es un regulador clave de la inmunidad adaptativa y humoral (20).

- **IL-17A.** Es una interleucina con un potente efecto para reclutar monocitos y neutrófilos e induce la producción de defensinas por las células epiteliales. Es producida por las células Th17 e inducida por la IL- β , el TNF- α , la IL-6, el TGF- β 1 y la IL-23. La IL-17 actúa como una citocina pro-inflamatoria que responde ante la invasión de patógenos bacterianos extracelulares, micobacterias y hongos y actúa en forma sinérgica con el TNF- α y la IL-1 β . Como se comentó previamente se ha reportado incrementada en pacientes con LEG (13).

III. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se conoce poco de la participación de las citocinas pro- y anti-inflamatorias en la fisiopatogenia del LEC. A pesar de que existe evidencia del papel de las células T en dicha patología, éste no ha sido completamente entendido. Más aún, el paradigma tradicional Th1/Th2 no explica los diferentes aspectos de la patología y la descripción de las células Th17 y Th22 y de sus citocinas abren nuevas posibilidades en el estudio del LEC y sus variantes. Por otra parte, los mecanismos de regulación relacionados con las células B productoras de IL-10 y las dendríticas plasmacitoides IDO⁺ aún no han sido descritos en el LEC. Con base en la escasa literatura existente, decidimos evaluar la presencia de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, así como de células B y T reguladoras (CD20/IL-10 y CD25/Foxp3) y dendríticas plasmacitoides (CD123^{hi}/CD196⁺/IDO⁺) en biopsias de piel y en células de sangre periférica de pacientes con LEC con manifestaciones específicas (LED y LECS) y su correlación con los niveles séricos de citocinas y con la actividad de la enfermedad; así como evaluar si estas respuestas son diferentes entre el LED y LECS.

La evaluación del comportamiento de estas citocinas permitirá ampliar nuestro conocimiento de la fisiopatogenia del LEC y en el futuro la identificación de posibles blancos terapéuticos.

IV. HIPÓTESIS

El perfil de citocinas pro-inflamatorias predominará sobre el perfil de citocinas anti-inflamatorias en pacientes con manifestaciones específicas de LEC activas.

Las células T y B reguladoras estarán disminuidas en biopsias de piel de pacientes con LEC en comparación con controles.

Las células dendríticas plasmacitoides estarán aumentadas en biopsias de piel de pacientes con LEC en comparación con controles.

La respuesta tanto inflamatoria como anti-inflamatoria será similar en pacientes con LED y en LECS.

V. OBJETIVOS

-

Objetivo general de la investigación:

Determinar y comparar la expresión de citocinas y subpoblaciones de células Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17A, IL-22), así como de células T (CD25/Foxp3), B reguladoras (CD20/IL-10) y dendríticas plasmacitoides (CD123^{hi}/IDO⁺) en biopsias de piel y sangre periférica de pacientes con LEC (LECS y LED) vs controles (individuos sanos y cicatriz hipertrófica).

Objetivos específicos:

- Cuantificar la expresión mediante inmunohistoquímica en biopsias de piel de pacientes con manifestaciones específicas de LEC (LED y LECS) activo de las siguientes subpoblaciones celulares: CD4/IL-4 (Th2), CD4/IL-17 (Th17), CD4/IL-22, CD4/INF- γ (Th1), CD20/IL-10 (Bregs), CD25/Foxp3 (Tregs) y CD123^h/IDO⁺ (dendríticas plasmacitoides).
- Comparar la expresión de las subpoblaciones celulares previamente mencionadas entre los subtipos de LED y LECS vs controles sanos y cicatrices hipertróficas.
- Conocer los niveles de las siguientes subpoblaciones celulares circulantes: CD4⁺/CD25⁺/IL-4⁺, CD4⁺/CD161⁺/IL-17⁺, CD4⁺/CD161⁺/IL-22⁺, CD4⁺/CD25⁺/INF- γ ⁺, CD123^{hi}/CD196⁺/IDO⁺ (dendríticas plasmacitoides), CD19⁺/CD38⁺/IL-10⁺ (Bregs) y CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ (Tregs) en pacientes con LEC (LED y LECS).
- Comparar los niveles de dichas subpoblaciones celulares circulantes entre los subtipos de LED y LECS vs controles sanos y cicatrices hipertróficas.
- Determinar los niveles séricos de IL-10, IL17A e IL-22 en pacientes con Lupus Eritematoso Cutáneo (LED y LECS), y compararlos en el suero de individuos sanos y con cicatrices hipertróficas.
- Correlacionar los hallazgos a nivel cutáneo y sérico en pacientes con LEC con el puntaje de la escala validada de actividad CLASI.
- Correlacionar los hallazgos en la expresión tisular con los niveles de las subpoblaciones de células: Th22, Th17, Th2, Th1, Tregs, Bregs y pDCregs circulantes.

VI. METODOLOGÍA

-

Diseño:

Se trata de un estudio transversal y comparativo.

Tamaño de muestra:

El cálculo de tamaño de la muestra se realizó con fórmula de comparación de promedios

$$n = \frac{2s^2 (Z\alpha + Z\beta)^2}{(d)^2}$$

Con la cual se obtuvo un tamaño de muestra de 15 pacientes con LEC y 15 controles sanos. Sin embargo ya que se evaluaron subtipos de LEC (LED y LECS) se incluyeron al menos 15 pacientes de cada uno de los grupos; y como un control adicional se incluyeron 5 pacientes con cicatriz hipertrófica.

Criterios de selección del grupo en estudio

a) Criterios de inclusión:

1. Hombres o mujeres mayores de 18 años de edad, con diagnóstico de LEG mediante criterios del ACR.
2. Que tengan manifestaciones cutáneas de tipo LEC-específicas del tipo LED y LECS activas basándose en la evaluación de una reumatóloga y dermatóloga en conjunto, y en estudio histopatológico de la lesión.
3. Que el sujeto esté dispuesto a participar en el estudio y sea capaz de proporcionar un consentimiento informado por escrito.

b) Criterios de exclusión

1. Pacientes con alguna otra manifestación cutánea concomitante que no sea atribuida al LEG.
2. Pacientes que tengan otra enfermedad autoinmune agregada al LEG
3. Pacientes con diagnóstico concomitante de alguna neoplasia o proceso infeccioso activo

c) Criterios de eliminación

1. Pacientes en quienes la biopsia de piel no sea óptima para su correcta evaluación (muestra insuficiente o mal procesada).

Criterios de selección del grupo control (Voluntarios Sanos)

a) Criterios de inclusión:

1. Hombres o mujeres mayores de 18 años de edad sin enfermedades autoinmunes.
2. Pacientes que sean sometidos a la resección de alguna lesión dermatológica no autoinmune benigna y en los cuales exista tejido sobrante de la lesión o se tenga que realizar la colocación de algún colgajo cutáneo. Se tomará un segmento de piel sana sobrante.
3. Que el sujeto esté dispuesto a participar en el estudio, y sea capaz de proporcionar un consentimiento informado por escrito.

b) Criterios de exclusión:

1. Pacientes con alguna enfermedad autoinmune.
2. Pacientes con diagnóstico cáncer a cualquier nivel (organo sólido o hematológico)
3. Pacientes que estén tomando algún medicamento inmunosupresor o antineoplásico.
4. Pacientes con algún proceso infeccioso activo

c) Criterios de eliminación:

1. Pacientes en quienes la biopsia de piel no sea óptima para su correcta evaluación (muestra insuficiente o mal procesada)

Criterios de selección del grupo control (Cicatriz Hipertrófica)

a) Criterios de inclusión:

1. Hombres o mujeres mayores de 18 años de edad sin enfermedades autoinmunes.
2. Pacientes que por cuestiones estéticas deseen retiro de una cicatriz hipertrófica que se encuentre en zonas fotoexpuestas.
3. Que el sujeto esté dispuesto a participar en el estudio, y sea capaz de proporcionar un consentimiento informado por escrito.

b) Criterios de exclusión:

1. Pacientes con alguna enfermedad autoinmune.
2. Pacientes con diagnóstico de una neoplasia de órgano sólido conocido.
3. Pacientes que estén tomando algún medicamento inmunosupresor o antineoplásico.

4. Pacientes con algún proceso infeccioso activo

c) Criterios de eliminación:

1. Pacientes en quienes la muestra piel no se óptima para su correcta evaluación (muestra insuficiente o mal procesada)

Procedimientos.

Los pacientes fueron evaluados por una reumatóloga y una dermatóloga en forma conjunta. Se registraron variables demográficas, uso de fármacos inmunosupresores y se calificó la escala de actividad de enfermedad CLASI, instrumento validado para este fin (23).

Las biopsias se obtuvieron por medio de un sacabocados de piel de 6 mm. Una parte de la biopsia fue enviada al Departamento de Patología para su procesamiento habitual (H&E) y el resto se utilizó para el análisis de inmunohistoquímica con el método de doble tinción.

Inmunohistoquímica.

A fin de identificar las células que expresan IL-22, se realizaron cortes de tejido embebido en parafina de 4- μ m de espesor, los cuales se colocaron en un portaobjetos electrocargado. Las laminillas se desparafinaron durante 45 min a 54°C. El tejido se hidrató con xileno, alcoholes al 100%, 96% y 50%) y agua destilada. Las laminillas se incuban con una solución de H₂O₂ al 3 % en metanol absoluto (1:9 vol/vol) durante 30 min, para eliminar la actividad de peroxidasa endógena. Los tejidos se incubaron durante 18 horas a 4°C con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-22 humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) a una concentración de 10 μ g/ml. La unión del anticuerpo al antígeno se identificó con un anticuerpo biotinado de burro anti-IgG de cabra (ABC Staining System; Santa Cruz Biotechnology). Las laminillas se incubaron con peroxidasa de rábano (HRP)–estreptavidina por 45 min, posteriormente se revelaron con 3,3'-diaminobencidina (DAB) (SIGMA-Aldrich) durante 10 min. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron con alcohol y xileno y se montaron en resina. El control negativo se realizó empleando suero humano diluido 1:100, en lugar del anticuerpo primario. El control de reactivos se llevó a cabo sustituyendo el anticuerpo primario con amortiguador fosfato y albúmina de huevo (Sigma-Aldrich). Estos controles excluyen la tinción inespecífica y la actividad de peroxidasa endógena.²⁴

Procedimiento de Doble-Tinción.

Para determinar la sub-poblaciones de células T-CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-4⁺, CD4⁺/IFN- γ ⁺, células T reguladoras CD25⁺/Foxp3⁺, células B productoras CD20⁺/IL-10⁺ y subpoblación de células CD123⁺/IDO⁺, se realizó detección simultánea [15]. Se utilizó sistema de doble-tinción de segunda generación de EnVision™ G|2 Doublestain System (Dako, Glostrup, Denmark) para la detección simultánea de dos antígenos presentes a bajas concentraciones en la misma biopsia. El procedimiento es una doble tinción secuencial, donde el primer antígeno es visualizado utilizando peroxidasa de rábano (HRP)/3'3'-diaminobenzidina (DAB) y el segundo antígeno es visualizado utilizando fosfatasa alcalina (AP)/Permanent Red. Brevemente, se realiza una incubación de las muestras con 200 μ l de bloqueadores de enzimas endógenas por 5 min. Este procedimiento inhibe la AP endógena, peroxidasa, y la actividad de la pseudoperoxidasa presente en los tejidos. Posteriormente los tejidos son incubados con 200 μ l de suero normal como control negativo o con los anticuerpos policlonales primarios de conejo anti-IL-17A, anti-IL-4, anti-IFN- γ , anti-IDO IgG o anticuerpos monoclonales de ratón anti-IL-10 o anti-Foxp3 IgG₁ (Santa Cruz Biotechnology) a 10 μ g/ml por 15 min, a temperatura ambiente.

Las muestras fueron incubadas con 200 μ l de polímero/HRP por 10 min. La reacción se visualizó con 200 μ l de DAB durante 5-15 min.

Posteriormente los tejidos fueron incubados con 200 μ l inhibidor de AP por 3 min y luego se incubaron con un suero normal como control negativo o con el segundo anticuerpo policlonal de conejo anti-CD20, anti-CD25 o un anticuerpo monoclonal anti-CD4 (Santa Cruz Biotecnología) o anti-CD123 (Abcam pcl, CA, Reino Unido) a una concentración de 10 μ g/ml, durante 15 min a temperatura ambiente. Después los tejidos se incubaron con 200 μ l del LINK durante 10 min. Finalmente, los tejidos se incubaron con 200 μ l de polímero AP durante 10 min. La reacción se visualizó con 200 μ l de cromógeno Permanent Red durante 5-20 min. Los tejidos fueron contra-teñidos con hematoxilina y montados en resina acuosa.

Para determinar el porcentaje de células inmunorreactivas se cuantificaron las CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-4⁺, CD4⁺/IFN- γ ⁺, T reguladoras CD25⁺/Foxp3⁺, B productoras de IL-10⁺/CD20⁺ y las pDCs CD123⁺/IDO⁺ en al menos dos campos (X320) en dos diferentes secciones de la epidermis y de la dermis de cada biopsia. Los resultados se reportaron como el promedio \pm error estándar y la mediana del porcentaje de células inmunorreactivas empleando el programa Image Pro Plus versión 5 · 1 · 1. ²⁴

Citometría de Flujo.

Un total de 16 donadores sanos (HD), 5 pacientes con cicatriz hipertrófica (CH), 20 pacientes con LED y 15 pacientes con LECS fueron reclutados para el estudio. Para realizar la inmunofenotipificación de las células circulantes, se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica (20 ml) de cada paciente y de ésta se aislaron las células mononucleares (CMNs) a través de un gradiente de densidad [Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway)].

Para determinar el porcentaje de células Th22 ($CD3^+/CD4^+/CD161^-/IL-22^+$), Th17 ($CD3^+/CD4^+/CD161^+/IL-17A^+$), Th2 ($CD3^+/CD4^+/CD25^+/IL-4^+$), Th1 ($CD3^+/CD4^+/CD25^+/IFN-\gamma^+$), de células T reguladoras ($CD3^+/CD4^+/CD25^{hi}/Foxp3^+$), de Bregs ($CD19^+/CD24^{hi}/CD38^{hi}/IL-10^+$) y pDCs ($CD123^{hi}/CD196^+/IDO^+$) las CMNs fueron incubadas con 5 μ L de anticuerpo monoclonal anti-CD3-FITC, anti-CD4-PeCy5 y anti-CD161-APC (BD Biosciences, San Jose, CA); anti-CD3-FITC, anti-CD4-PeCy5 y anti-CD25-APC (BD Biosciences, San Jose, CA); anti-CD19-APC, anti-CD38-PeCy5, anti CD24- FITC o anti-CD123-FITC, anti-CCR6-PeCy5 en tubos separados durante 20 min a 37°C en oscuridad. Las células fueron permeabilizadas con 200 μ L de solución cytofix/cytoperm (BD Biosciences) a 4°C por 30 min. La tinción intracelular se llevó a cabo mediante la incubación con 5 μ L de un anticuerpo anti-IL-22-PE, anti-IL-17A-PE, anti-IL-4-PE, anti-IFN- γ -PE, anti-Foxp3-PE anti-IL-10-PE o anti-IDO-PE (BD Biosciences) durante 30 min a 4°C y en oscuridad. Finalmente, un total de 500,000–1,000,000 de eventos fueron adquiridos de cada muestra en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences) y se analizaron con el programa FlowJo X software (Tree Star, Inc.).²⁵

Para el análisis de las muestras adquiridas se trazó una ventana electrónica para las células $CD3^+/CD4^+/CD161^-$, $CD3^+/CD4^+/CD161^+$, $CD3^+/CD4^+/CD25^+$, $CD3^+/CD4^+/CD25^{hi}$, $CD19^+/CD38^{hi}/CD24^{hi}$ o $CD123^{hi}/CCR6^+$. Los resultados se expresaron como el porcentaje relativo de las células $IL-22^+$, $IL-17A^+$, $IL-4^+$, $IFN-\gamma^+$, $Foxp3^+$, $IL-10^+$ o IDO^+ en cada ventana electrónica.

Como control de isotipo se empleó una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón de tipo $IgG_{1,k}$ -FITC/ IgG_1 -PE/ $CD45$ -PeCy5 (BD Tritest™, BD Biosciences). Además se realizó un control de autofluorescencia y los respectivos controles FMO (fluorescence minus one).

ELISA.

Los niveles séricos de IL-22, IL-17A e IL-10 fueron medidos por ensayos inmunoenzimáticos de tipo ELISA utilizando kits comerciales (BioLegend Inc., San Diego, CA, USA.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Consideraciones Éticas.

Este trabajo fue realizado de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki. El estudio fue aprobado por el comité de ética de nuestra institución y se obtuvo consentimiento informado por escrito de todos los sujetos.

Estadística.

Se realizó estadística descriptiva no paramétrica, de acuerdo a la distribución de las variables. Las variables categóricas se compararon mediante la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher. Se realizó estadística no paramétrica para la comparación de medianas entre grupos mediante el análisis de Kruskal Wallis, utilizando la prueba de Holm-Sidak, para todos los procedimientos de comparación múltiple. Para el análisis de correlación se utilizó la prueba de Rho de Spearman. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 20.0 y Sigma Stat 11.2 (Aspire Software International, Leesburg, VA, EE.UU.). Los datos se expresan como la mediana, el intervalo mínimo-máximo y el promedio \pm desviación estándar (SD) / Error estándar de la media (SEM) de acuerdo a la distribución de cada variable. Los valores de P menores o iguales a 0,05 fueron considerados como significativos.

VII. RESULTADOS

-

Características clínicas y demográficas de los pacientes

Se incluyeron 35 pacientes con diagnóstico de Lupus Cutáneo, de los cuales 20 pacientes tenían LED y 15 pacientes con LECS; 16 muestras de sujetos voluntarios sanos y 5 muestras de cicatrices hipertróficas.

El 95% de la muestra de pacientes con LEC; así como todos los controles sanos y con cicatrices hipertróficas eran mujeres.

La mediana de edad en el grupo de LED fue de 35 años (20-62), en el grupo de LECS de 39 años (18-74).

El tiempo de evolución del LEG en los pacientes con LED fue de 7 (1-26) años y de aquellos con LECS fue de 6 (0.5-41) años, no hubo diferencia significativa entre las medianas de ambos grupos.

En relación con la puntuación de actividad cutánea evaluada mediante el CLASI, los pacientes con LED tuvieron una mediana de 11 puntos (intervalo: 2-25), mientras que los pacientes con LECS tuvieron una mediana de puntuación de actividad de 21 puntos (intervalo: 9-37).

El 80% de los pacientes con diagnóstico de LECS recibían prednisona vía oral al momento de la evaluación, la mediana de dosis en dicho grupo fue de 10 mg/día; mientras que en el grupo de pacientes con LED el 65% recibían prednisona, la mediana de dosis fue de 5mg/día en dicho grupo.

El uso de antimaláricos fue en el 67% en el grupo de pacientes con LECS y 75% en el grupo de pacientes con LED.

El resumen de las características basales en los grupos de estudios se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Características Demográficas, Clínicas y de Laboratorio de los Pacientes con Lupus Cutáneo

	Lupus Eritematoso Cutáneo		Sanos (n=16)	Cicatriz Hipertrófica (N=5)	Valor P
	LECSA (n=15)	LED (n=20)			
Edad (años)					
Mediana	35	39	45	28.5	0.003
Intervalo	(20-62)	(18-74)	(21-76)	(24-33)	
Sexo (Mujer %)	(93%)	(95%)	(100%)	(100%)	NS
Leucocitos (cél/ml)					
Mediana	6,100	5,200	5,500	ND	NS
Intervalo	(2,200-15,700)	(2,400-6,700)	(4,200-8,200)		
Linfocitos %					
Mediana	19%	19.5%	29%	ND	0.028
Intervalo	(8%-33%)	(14%-33%)	(18%-47%)		
VSG (mmHg)					
Mediana	9.5	7.5	6	1	0.0024
Intervalo	(2-48)	(2-28)	(2-18)	(1-14.5)	
Duración LEG (años)					
Mediana	6	7	--	---	NS
Intervalo	(0.5 -41)	(1-26)			
Anti-dDNA (UI/ml)					
Mediana	45.3	15.7			<0.001
Intervalo	(12-447)	(8-111)			
Actividad CLASI					
Mediana	21	11	---	---	<0.001
Intervalo	(9-37)	(2-25)			
Prednisona Dosis (mg/día)					
Mediana	10	5	---	---	0.0037
Intervalo	(0-50)	(0-30)			
Antimaláricos n (%)	66.7	75	---	---	0.043

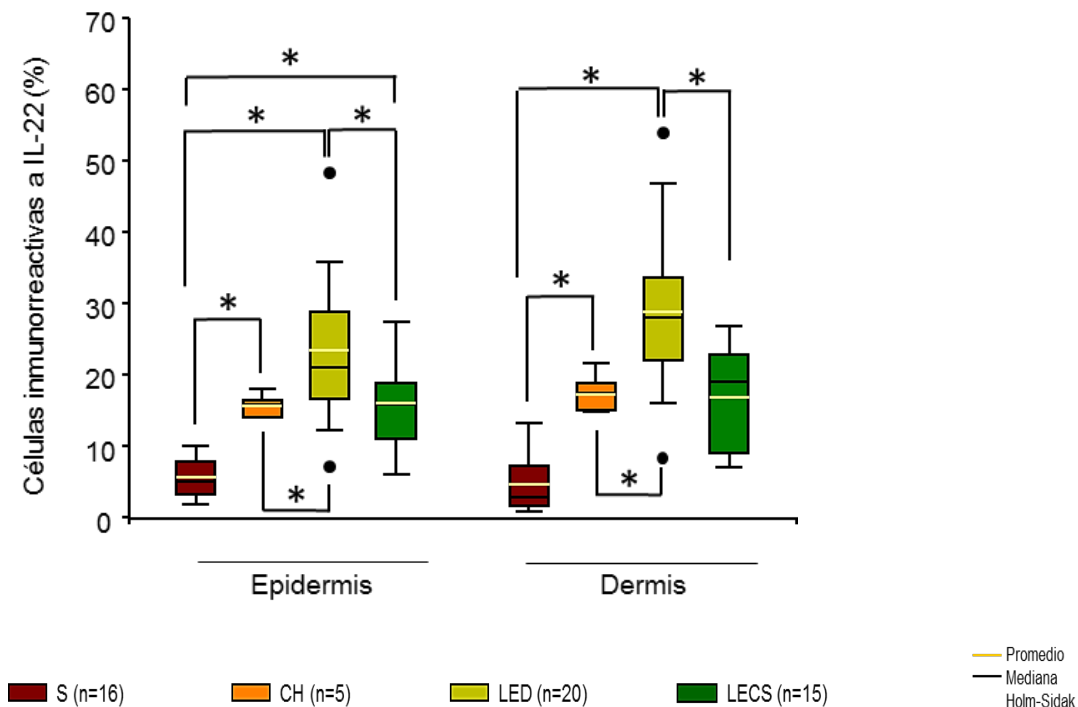
Intervalo (mínimo-máximo)

Determinación tisular de la subpoblación de células Th122 (CD4⁺/IL-22⁺)

Mediante la técnica de inmunohistoquímica en las biopsias de piel se determinó el número de células que expresó IL-22 tanto en la epidermis como en dermis, encontrado que en las muestras de pacientes con LED la mediana del porcentaje relativo de células inmunorreactivas en la epidermis fue del 21% (intervalo 7-49) y en la dermis del 28% (intervalo 8-55), mientras que en las muestras de pacientes con LECS fue del 16% (intervalo 2-55) y del 19% (intervalo 7-31) en la dermis y epidermis respectivamente. En relación al porcentaje de expresión en los controles, encontramos que en el tejido de individuos sanos la mediana de células inmunorreactivas en la epidermis fue del 5% (intervalo 2-10.5) y en la dermis del 3% (intervalo 1-14); mientras que en las muestras de cicatriz hipertrófica la mediana fue del 16% (intervalo 14-18) y del 17.5% (intervalo 15-22) en la dermis y epidermis, respectivamente como se resume en la Tabla 2a.

El porcentaje de células IL-22⁺ fue significativamente mayor en ambos grupos de LEC en comparación con el tejido de individuos sanos. Además, el porcentaje de células productoras de IL-22 fue mayor en pacientes con LED *versus* el grupo de LECS y de cicatrices hipertróficas (Figura 1).

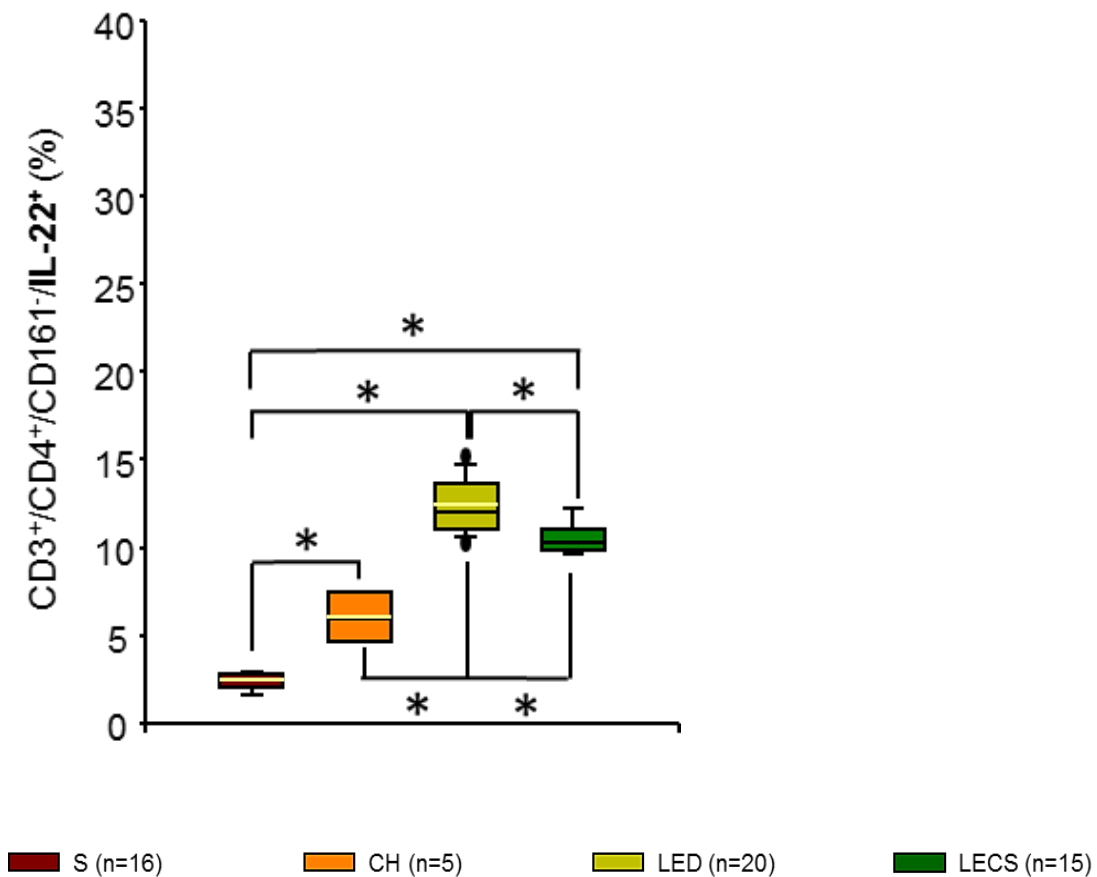
Figura 1.



Determinación del Porcentaje de Células Th22 Circulantes

La evaluación por citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones de células T mostró que el porcentaje de células Th22 en sangre periférica de los pacientes con LEC fue significativamente mayor en comparación con ambos grupos de controles (sanos y cicatrices hipertróficas). Al igual que lo reportado mediante inmunohistoquímica, en las muestras de sangre periférica de pacientes con LED el porcentaje de células Th22 (mediana 12.1%, intervalo: 10.2-15.2), fue significativamente mayor que en pacientes con LECS (10.3%, intervalo: 9.5-12.5). Ver Tabla 3a, 3b y Figura 2.

Figura 2.

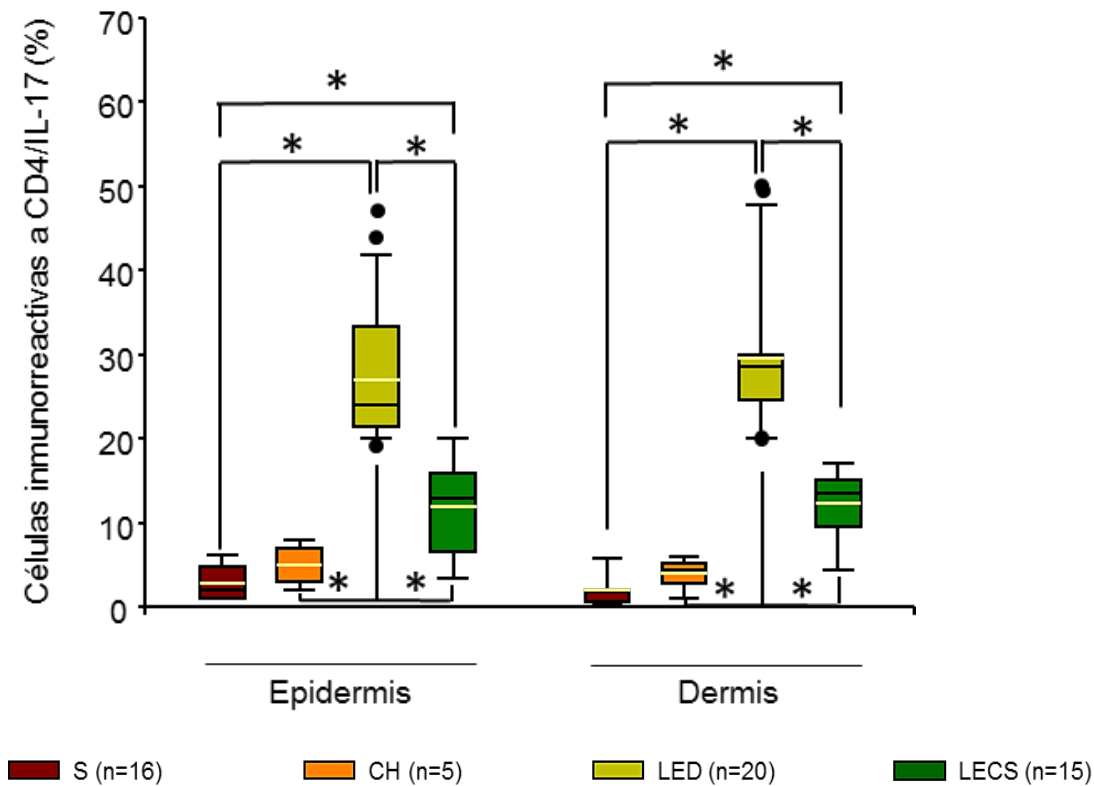


Determinación tisular de la subpoblación de células Th17 (CD4⁺/IL-17⁺)

El porcentaje de células T CD4⁺ que expresaron IL-17 en la epidermis de pacientes con LED fue del 24% (intervalo: 19 – 44) y en la dermis del 28.5% (intervalo: 20 - 50), en las muestras de LECS la mediana en la epidermis fue del 13% (intervalo: 3 - 21) y en la dermis fue 13.5% (intervalo: 4 - 18), mientras que en los controles sanos en la epidermis fue 2% (intervalo: 1-8), en la dermis 2% (intervalo: 0-7) y en cicatrices hipertróficas en la epidermis fue 5% (intervalo: 2-8) y en la dermis 4.5% (intervalo: 1-6) (Tabla 2a).

La determinación de células CD4⁺/IL-17⁺ fue significativamente mayor en ambos grupos de LEC en comparación con el tejido de los controles sanos y de las cicatrices. El porcentaje de células CD4⁺/IL-17⁺ fue significativamente mayor tanto en epidermis como en dermis en las muestras de pacientes con LED *versus* controles (sanos y cicatriz) y *versus* pacientes con LECS. (Figura 3 y Tabla 2a - 2b).

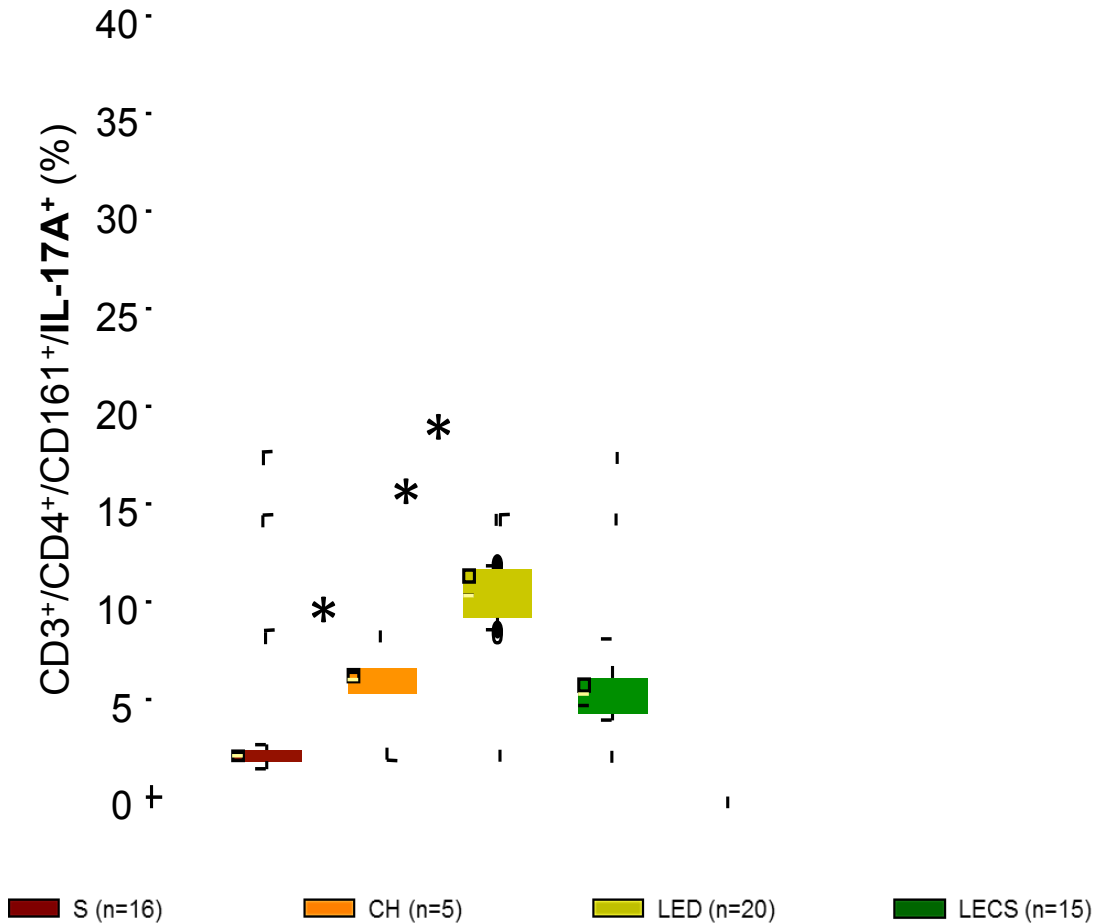
Figura 3.



Determinación del Porcentaje de Células Th17 Circulantes

El porcentaje de células circulantes $CD3^+/CD4^+/CD161^+/IL-17A^+$ de los pacientes con LED fue del 10.3% (intervalo: 8.5 – 11.9) y en pacientes con LECS fue del 4.7% (intervalo: 3.9 – 9.0), en ambos grupos el porcentaje fue significativamente mayor que en sujetos sanos (mediana: 2.2%, intervalo 1.1 – 2.8) (Tabla 3a y 3b). Como se observa en la Figura 4 y en la tabla 3b el porcentaje de células Th17 circulantes en sangre periférica, al igual que lo observado en tejido, fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con LED.

Figura 4.

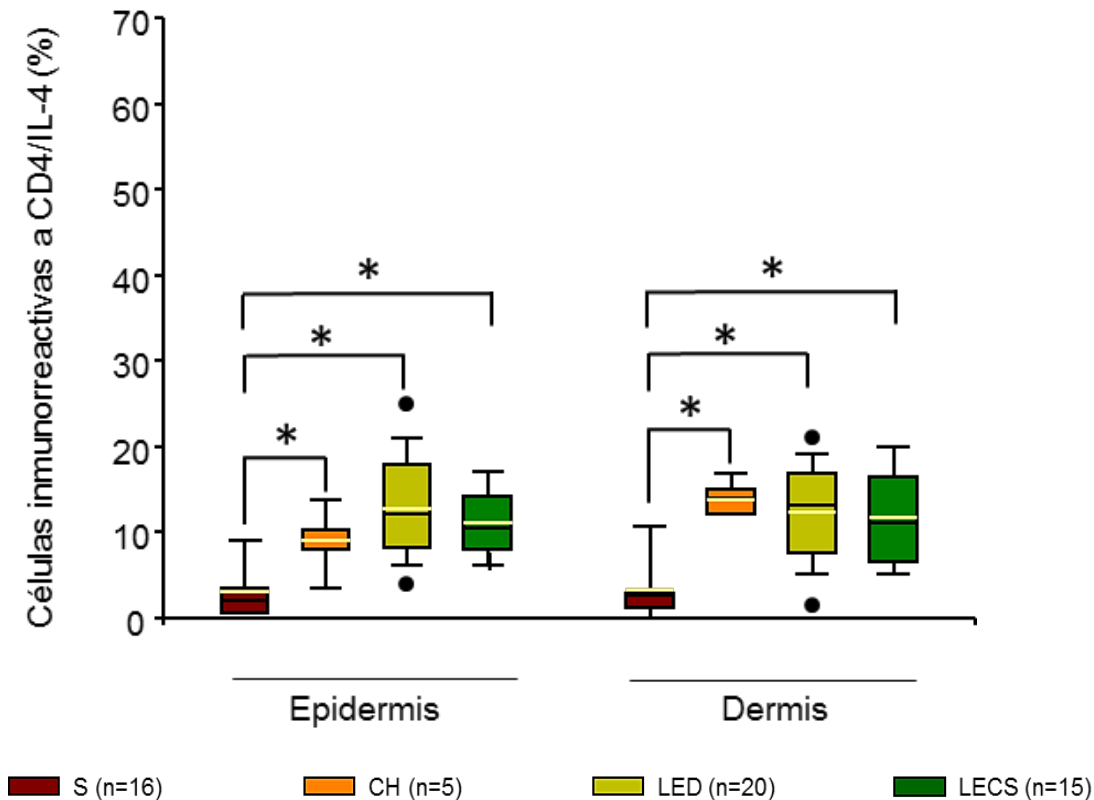


Evaluación del porcentaje tisular de células Th2 (CD4⁺/IL-4⁺)

En las biopsias de epidermis de los pacientes con LED el porcentaje de células T CD4⁺ que expresaron IL-4⁺ fue del 12% (intervalo: 4 – 25) y en la dermis del 13% (intervalo: 2 - 21), en las muestras de LECS la mediana en la epidermis fue del 10.5% (intervalo: 6 - 18) y en la dermis fue del 11% (intervalo: 4 - 22), mientras que en los controles sanos en la epidermis fue del 2% (intervalo: 1 - 15), en la dermis 3% (intervalo: 0 - 13) y en cicatrices hipertróficas en la epidermis fue del 9% (intervalo: 3 - 14) y en la dermis 14% (intervalo: 12 - 17). (Tabla 2a).

La expresión de células CD4⁺/IL-4⁺ fue significativamente mayor en ambos grupos de LEC (LED y LECS) en comparación con el porcentaje encontrado en el tejido de controles sanos. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de células CD4⁺/IL-4⁺ entre las muestras de pacientes con LED y LECS, así como entre ambos subtipos y las muestras de cicatriz. (Figura 5 y Tabla 2a - 2b).

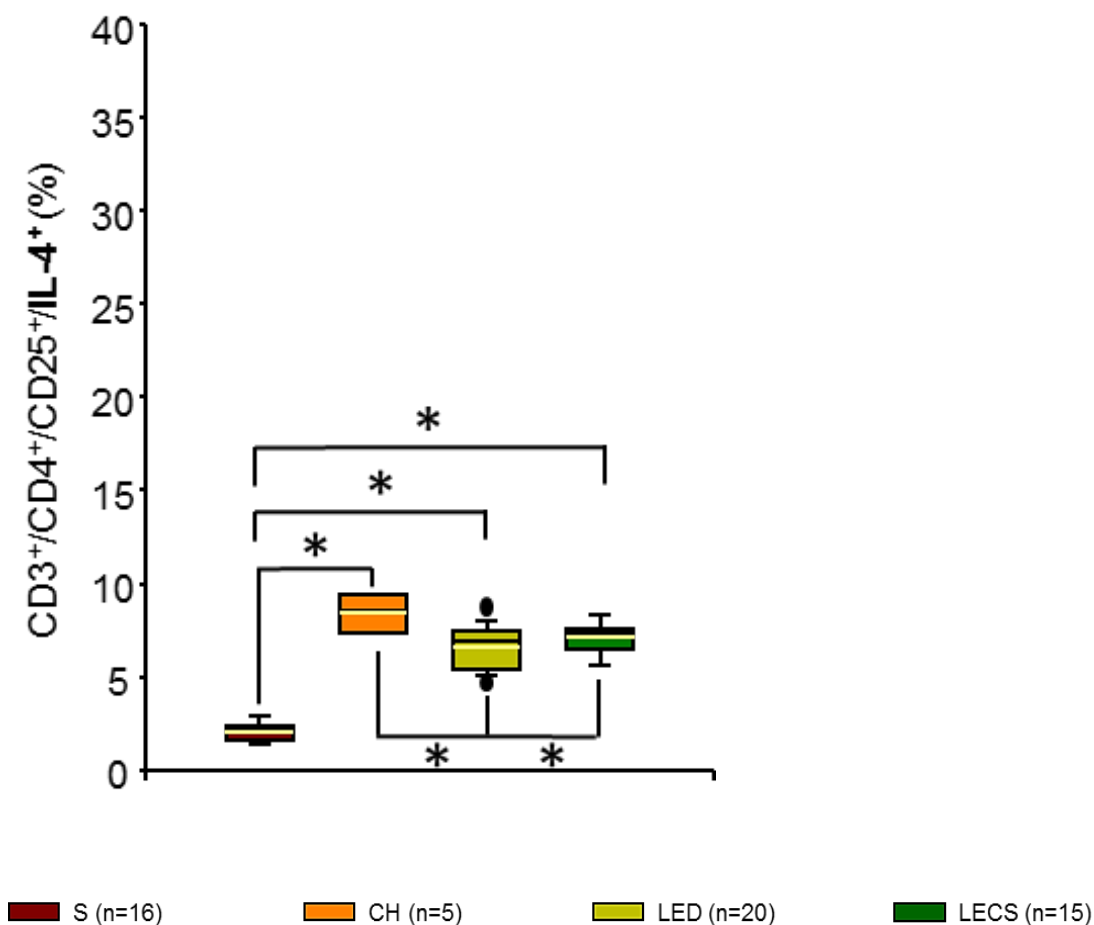
Figura 5



Determinación del Porcentaje de Células Th2 Circulantes

El porcentaje de células circulantes $CD3^+/CD4^+/CD25^+/IL-4^+$ de los pacientes con LECS fue del 7.3% (intervalo: 6 – 8) y en pacientes con LED fue del 7% (intervalo: 5 – 9), en ambos grupos fue significativamente mayor que en sujetos sanos (mediana: 2%, intervalo 1 – 3). Como se observa en la figura y en la tabla 3a y 3b, No hubo diferencia significativa en el porcentaje de células $CD3^+/CD4^+/CD25^+/IL-4^+$ en sangre periférica entre los subgrupos de LEC (LED *versus* LECS). Se encontró un porcentaje significativamente mayor de células Th2 en sujetos con cicatriz en comparación con el resto de los grupos (Figura 6)

Figura 6.

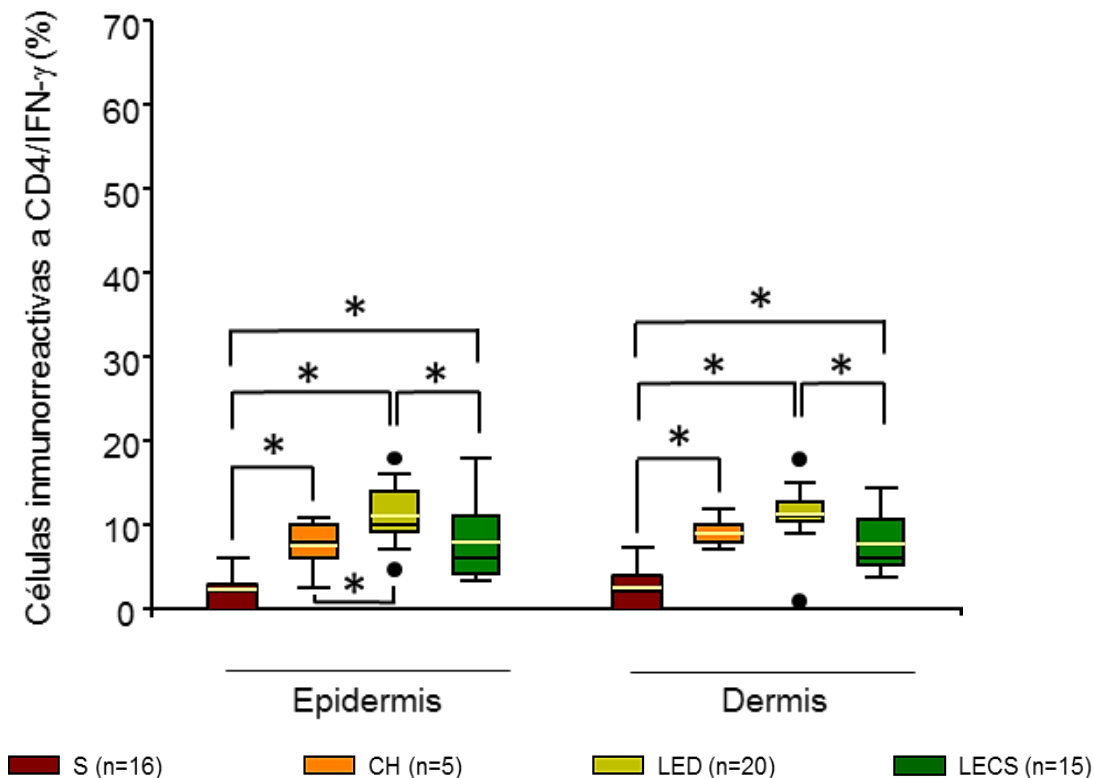


Determinación del Porcentaje Tisular de Células Th1 (CD4⁺/IFN- γ)

En las biopsias de epidermis de pacientes con LED el porcentaje de células T CD4⁺ que expresaron IFN- γ fue del 10% (intervalo: 5 – 18) y en la dermis del 11% (intervalo: 1 - 18), en las de LECS la mediana en la epidermis fue del 6% (intervalo: 3 - 22) y en la dermis fue del 6% (intervalo: 3.5 - 16), mientras que en los controles sanos en la epidermis fue del 2% (intervalo: 0 – 6), en la dermis del 2% (intervalo: 0 - 9) y en las cicatrices hipertróficas fue del 8% (intervalo: 2 - 11) y del 9% (intervalo: 7 - 12) en epidermis y dermis, respectivamente (Tabla 2a).

La expresión de células CD4⁺/IFN- γ ⁺ fue significativamente mayor en ambos subtipos de LEC en comparación el porcentaje expresado con tejido de controles sanos. El porcentaje de células Th1 fue significativamente mayor tanto en epidermis como en dermis en las muestras de pacientes con LED, en comparación con LECS. No hubo diferencia significativa en el porcentaje de estas células entre los subtipos de LEC y cicatriz hipertrófica. (Figura 7 y Tabla 2a - 2b).

Figura 7

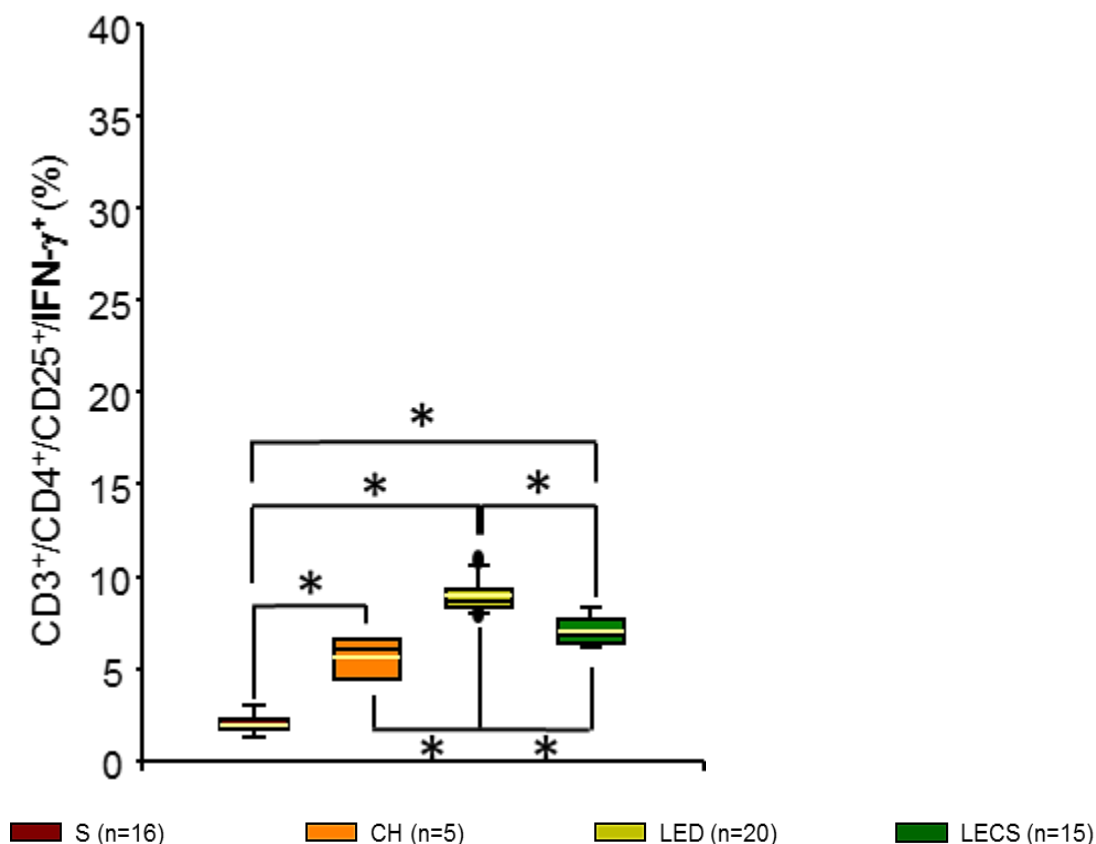


El porcentaje de células circulantes en sangre periférica con inmunofenotipificación CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/IFN- γ ⁺, de los pacientes con LED fue 8.7% (intervalo: 8.0 – 10.9) y en pacientes con LECS fue 6.8% (intervalo: 6.1 – 8.4). (Tabla 3a).

Determinación del Porcentaje de Células Th1 (CD4⁺/IFN- γ) circulantes

El porcentaje de células circulantes CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/IFN- γ ⁺ fue significativamente mayor en ambos subtipos de LEC en comparación con los controles sanos (mediana: 2%, intervalo 1 – 3) y de cicatriz (mediana: 6%, intervalo: 3 - 7). Asimismo el porcentaje de células CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/IFN- γ ⁺ fue significativamente mayor en sangre periférica entre en el subgrupo de LED *versus* con el resto de los grupos, incluyendo aquellos con LECS (Figura 8, Tabla 3a y 3b).

Figura 8

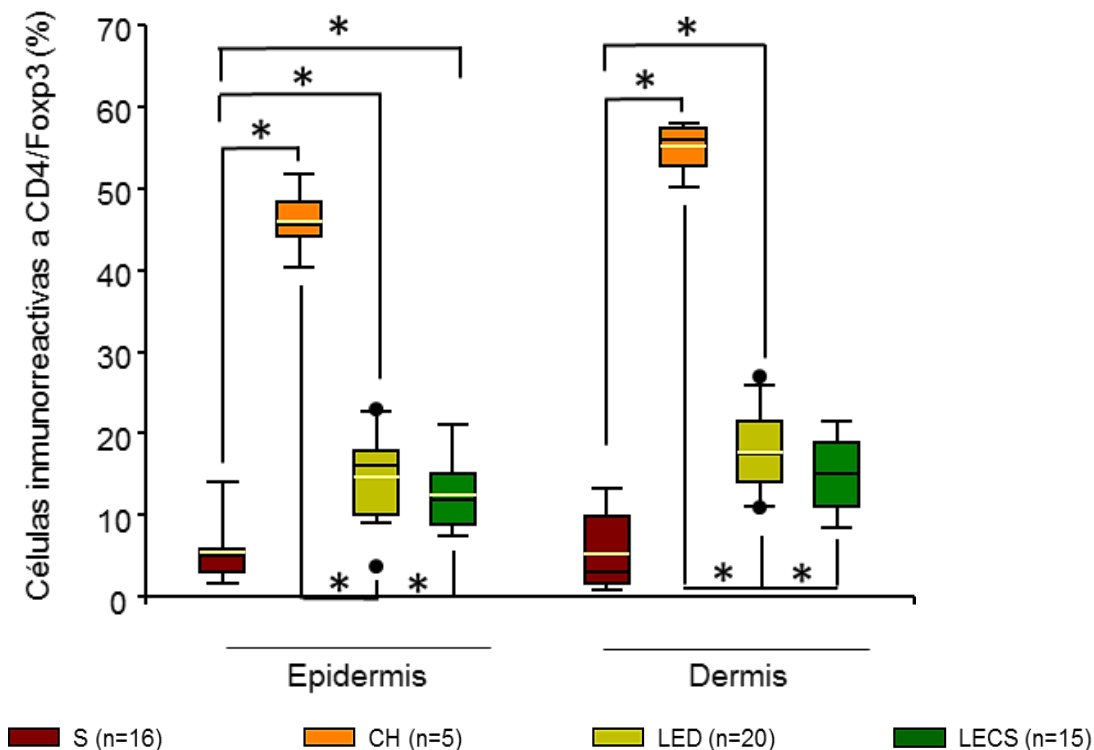


Evaluación de Células Treg (CD25⁺Foxp3⁺) en tejido

En las biopsias de epidermis de pacientes con LED el porcentaje de células CD25⁺ que expresaron Foxp3 en la epidermis de pacientes con LED fue del 16% (intervalo: 4 – 23) y en la dermis del 18% (intervalo: 11 - 27), en las biopsias de LECS la mediana en la epidermis fue del 12% (intervalo: 7 - 24) y en la dermis fue del 15% (intervalo: 9 – 22), mientras que en los controles sanos en la epidermis fue del 5% (intervalo: 1 – 14), en la dermis 3% (intervalo: 1 - 15) y en cicatrices hipertróficas en la epidermis fue del 50% (intervalo: 40 - 52) y en la dermis del 56% (intervalo: 50 - 58) (Tabla 2a).

El porcentaje de células CD25⁺/Foxp3⁺ en biopsias de piel fue significativamente mayor en ambos subtipos de LEC en comparación con el de controles sanos. No hubo diferencia significativa en el porcentaje de células CD25⁺/Foxp3⁺ en la dermis y epidermis de las muestras de los pacientes con LED *versus* los de LECS. Sin embargo, el porcentaje de CD25⁺/Foxp3⁺ fue significativamente mayor en las cicatrices en comparación con el resto de los grupos estudiados (Tabla 2a - 2b y Figura 9).

Figura 9.



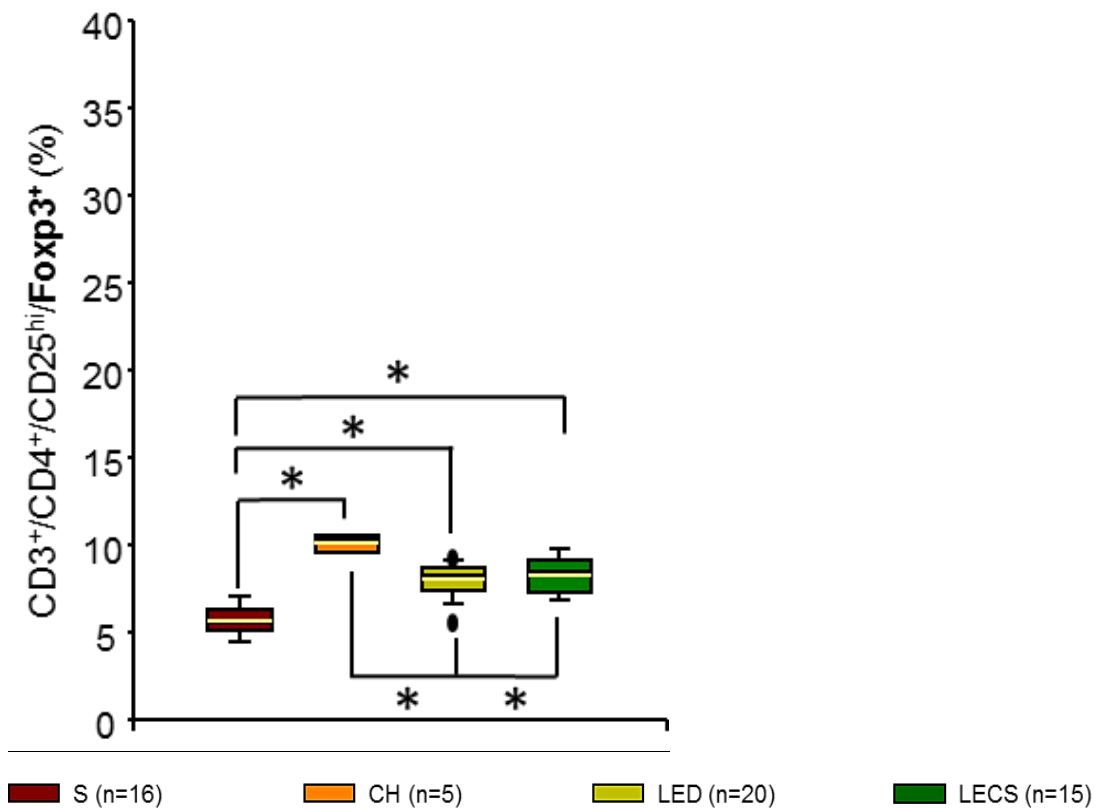
Determinación del Porcentaje de Células Tregs Periféricas

El porcentaje de células circulantes $CD3^+/CD4^+/CD25^{hi}/Foxp3^+$ de los pacientes con LED fue del 8% (intervalo: 6 – 9) y en pacientes con LECS fue del 9% (intervalo: 7 – 10), (Tabla 3a).

El porcentaje de células circulantes $CD3^+/CD4^+/CD25^{hi}/Foxp3^+$ fue significativamente mayor en ambos subtipos de LEC en comparación con los sujetos sanos (mediana: 6%, intervalo 4 – 7).

No hubo diferencia significativa en el porcentaje de células $CD3^+/CD4^+/CD25^{hi}/Foxp3^+$ en sangre periférica entre los subgrupos de LEC (LED vs LECS). Sin embargo, encontramos un porcentaje significativamente mayor de células Treg ($CD3^+/CD4^+/CD25^{hi}/Foxp3^+$) en los sujetos con cicatriz hipertrófica en comparación con el resto de los grupos (Tabla 3a y 3b y Figura 10)

Figura 10.

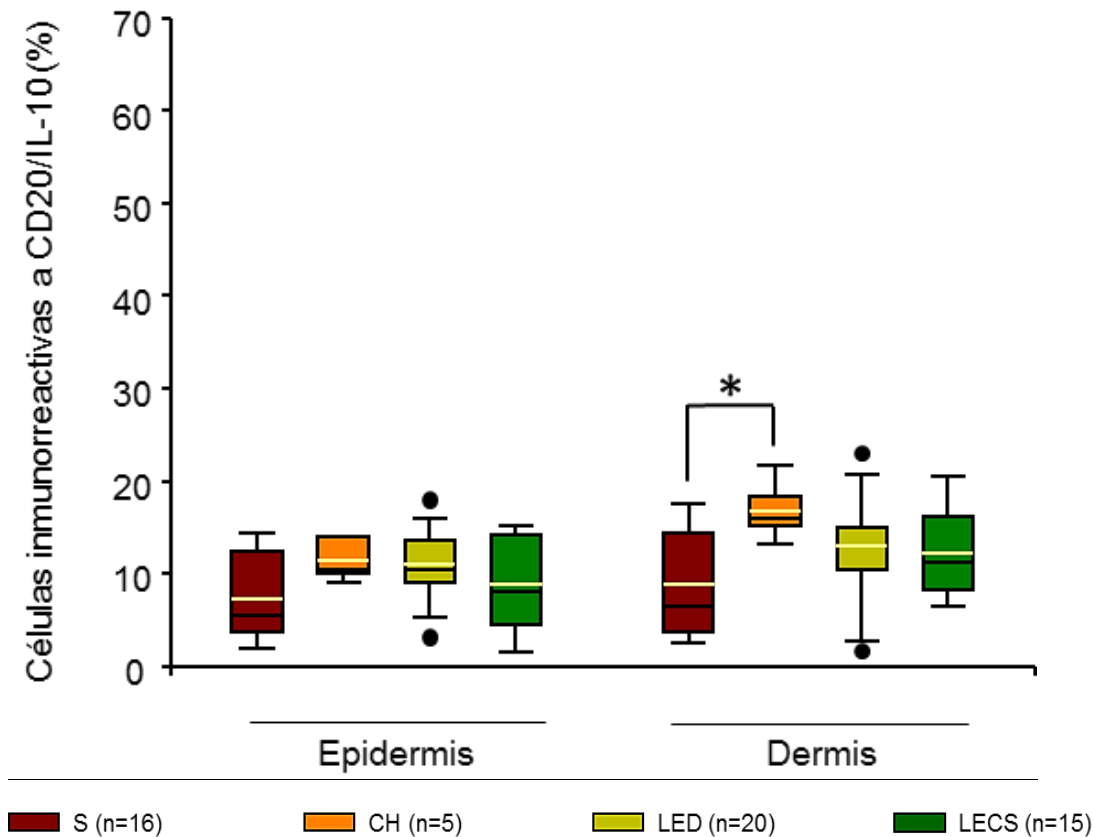


Evaluación del Porcentaje de Células Breg (CD20⁺/IL-10⁺)

En las biopsias de epidermis de los pacientes con LED el porcentaje de células CD20⁺ que expresaron IL-10⁺ fue del 11% (intervalo: 3 – 18) y en la dermis del 13% (intervalo: 2 - 23), en las biopsias de LECS la mediana en la epidermis fue del 8% (intervalo: 1 – 16) y en la dermis fue del 11% (intervalo: 6 – 24), mientras que en los controles sanos en la epidermis fue del 6% (intervalo: 2 – 15), en la dermis del 7% (intervalo: 2 - 20) y en cicatrices hipertróficas fue del 11% (intervalo: 9 - 14) y del 16% (intervalo: 13 - 22) en la epidermis y la dermis, respectivamente (Tabla 2a).

No hubo diferencia significativa en el porcentaje de células CD20⁺/IL-10⁺, entre los subtipos de LEC y los controles sanos y con cicatriz hipertrófica. Tampoco encontramos diferencia significativa en el porcentaje de dichas células entre las muestras de LED y LECS (Tabla 2a - 2b, Figura 11).

Figura 11.

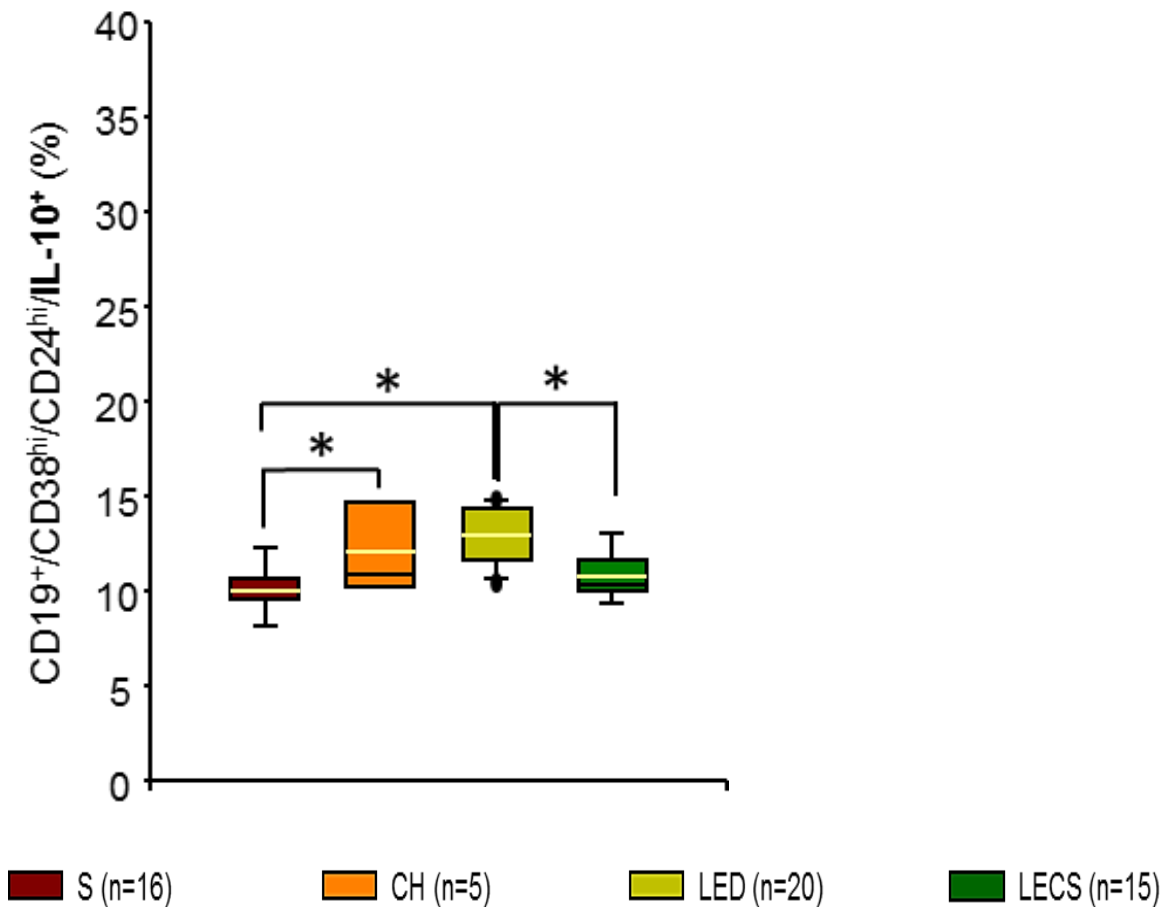


Determinación del Porcentaje de Células Breg (CD20⁺/IL-10⁺) Periféricas

El porcentaje de células circulantes CD19⁺/CD24^{hi}/CD38^{hi}/IL-10⁺ de los pacientes con LED fue del 13% (intervalo: 10 – 15) y en pacientes con LECS del 10% (intervalo: 9 – 13), (Tabla 2a).

El número de células Bregs fue significativamente mayor en los pacientes con LED *versus* los sujetos sanos (mediana: 10%, intervalo 8 – 13) y con los pacientes con LECS. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de células CD19⁺/CD24^{hi}/CD38^{hi}/IL-10⁺ en sangre periférica entre los otros grupos estudiados (Tabla 3a,3b y Figura 12).

Figura 12

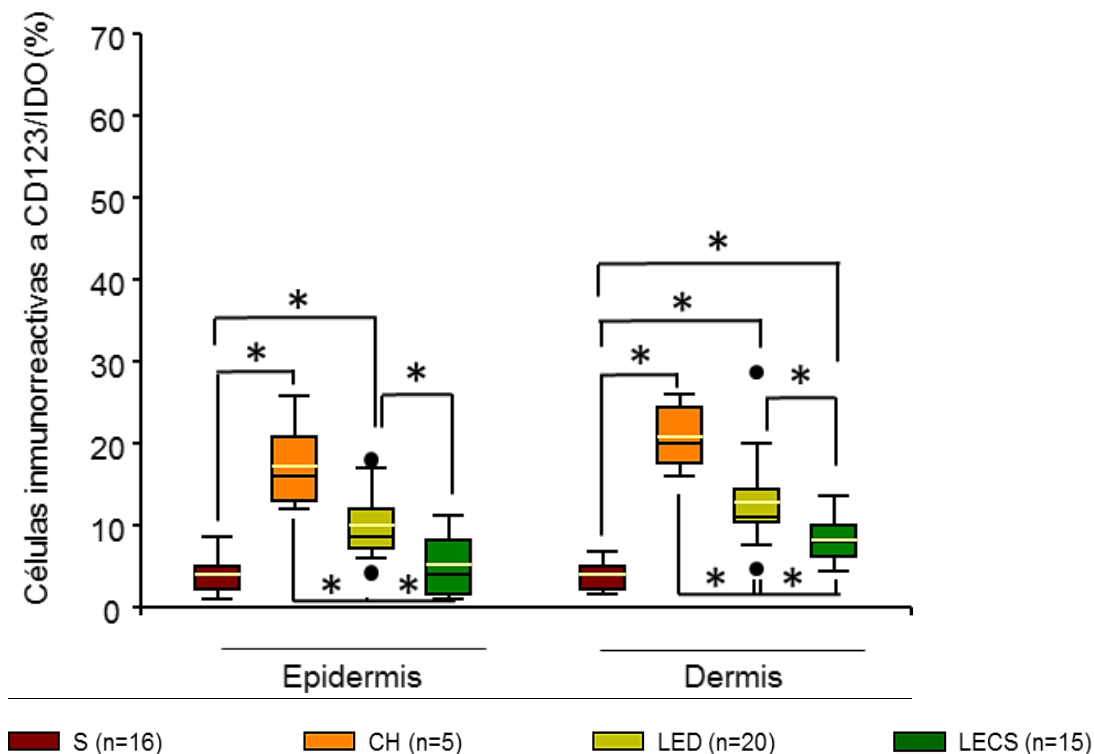


Evaluación Tisular de Células pDCregs (CD123^{hi}/CD196⁺/IDO⁺)

En las biopsias de epidermis de pacientes con LED el porcentaje de células CD123⁺ que expresan IDO fue del 9% (intervalo: 4 – 18) y en la dermis del 11% (intervalo: 5 - 29), en muestras de LECS la mediana en la epidermis fue del 4% (intervalo: 1 – 12) y en la dermis fue del 8% (intervalo: 4 – 16), mientras que en los controles sanos en la epidermis fue del 4% (intervalo: 1 – 11), en la dermis del 4% (intervalo: 1 - 8) y en cicatrices hipertróficas del 16% (intervalo: 12 - 26) y 20% (intervalo: 16 - 26) en la epidermis y dermis, respectivamente (Tabla 2a).

El porcentaje de células CD123⁺/IDO⁺, fue significativamente mayor en las muestras de pacientes con LED, tanto en la epidermis como en la dermis en comparación con controles sanos; mientras que en las muestras de pacientes con LECS, solo fue significativamente mayor el porcentaje de células pDCregs en la dermis en comparación con los controles sanos. Encontramos un porcentaje de expresión de células pDCs significativamente mayor tanto en epidermis y dermis en las muestras de pacientes con subtipo LED en comparación con LECS (Tabla 2a - 2b, Figura 13).

Figura 13.



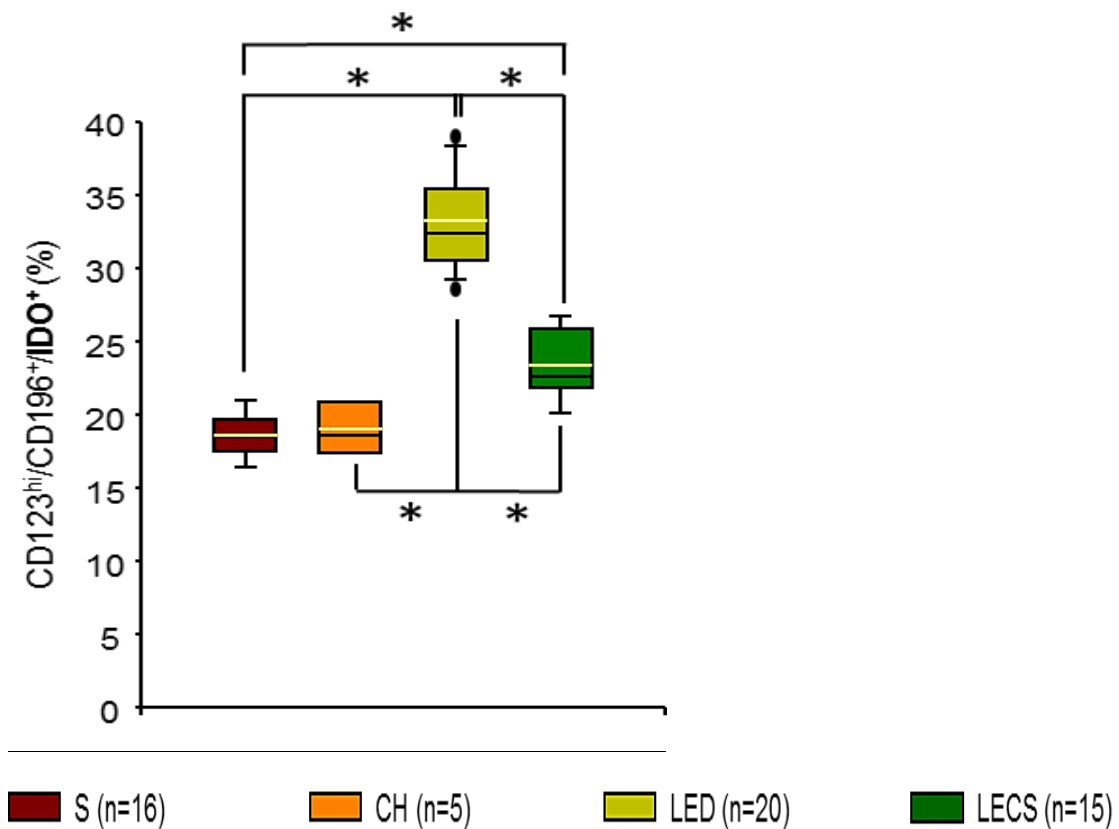
Determinación del Porcentaje de pDCregs (CD123^{hi}/CD196⁺/IDO⁺) Periféricas

El porcentaje de células circulantes CD123^{hi}/CD196⁺/IDO⁺ de los pacientes con LED fue del 32% (intervalo: 29 – 39) y en pacientes con LECS fue del 23% (intervalo: 20 – 27).

El número de células pDCregs fue significativamente mayor en ambos subtipos de LEC en comparación con los sujetos sanos (mediana: 18%, intervalo 15 – 22) y los de cicatriz hipertrófica (mediana: 19%, intervalo: 17 – 22)

Los pacientes con LED presentaron un número mayor de células pDCregs en comparación con el resto de los grupos, incluyendo aquellos con LECS (Tabla 3a y 3b, Figura 14).

Figura 14



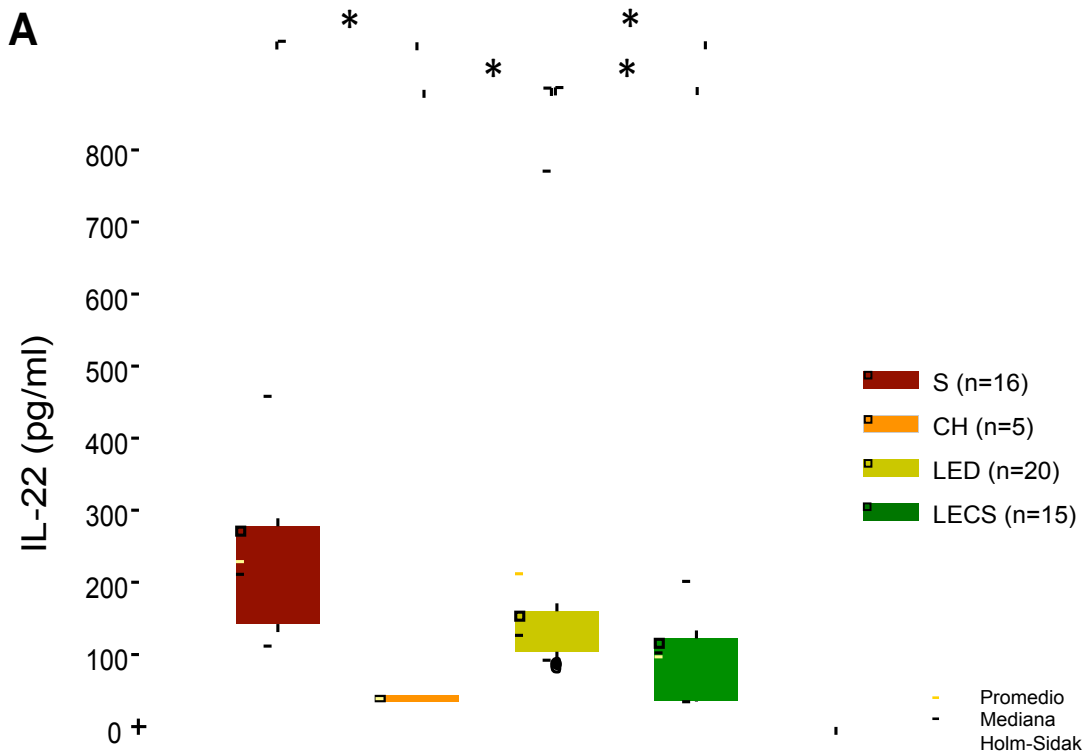
Niveles séricos de IL-22, IL-17A e IL-10

Mediante la técnica de ELISA se determinaron los niveles séricos de IL-22, IL-17A e IL-10 en los grupos en estudio (LED, LECS, controles sanos y con cicatriz hipertrófica) (Tabla 4a y 4b).

La mediana de IL-22 en los pacientes con LED fue de 126.4 pg/ml (intervalo: 85.8 – 955.5 pg/ml) mientras que en pacientes con LECS fue 101.9 pg/ml (intervalo: 34.4 - 249.9 pg/ml), siendo la diferencia entre ambos grupos significativa.

En controles sanos la mediana de concentración sérica de IL-22 fue de 211 pg/ml (intervalo: 106.3 – 517.5 pg/ml), significativamente mayor en comparación con la concentración en el grupo de LECS, mientras que los controles con cicatriz hipertrófica la mediana de concentración sérica fue de 37.5 pg/ml (intervalo: 32.2 - 45.2 pg/ml) significativamente menor a la concentración observada en el grupo de LED y controles sanos. (Tabla 4a y 4b, Figura 15)

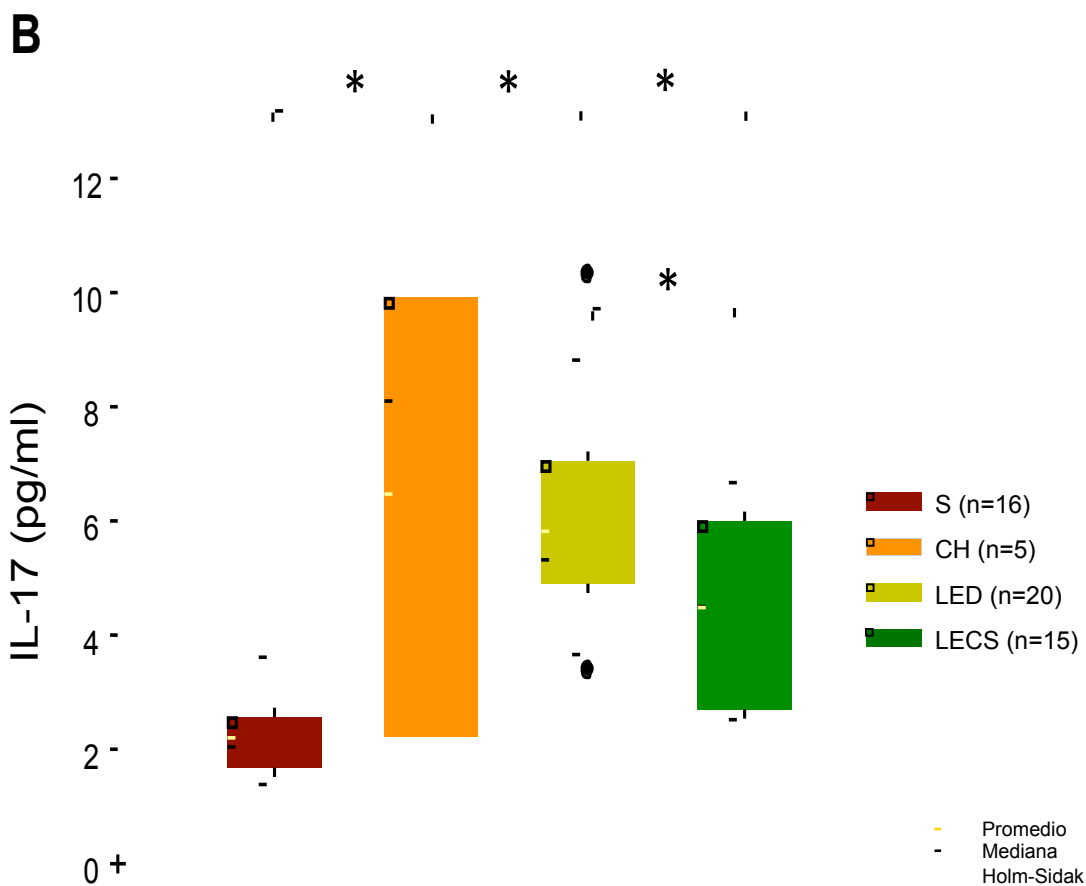
Figura 15



Las concentraciones séricas de IL-17 en los pacientes con LED fue de 5.3 pg/ml (intervalo: 3.4 – 10.4 pg/ml) mientras que en pacientes con LECS fue de 4.5 pg/ml (intervalo: 2.3 – 6.8 pg/ml), siendo la diferencia entre ambos grupos significativa $P=0.05$.

En controles sanos la mediana de concentración sérica de IL-17 fue de 2.0 pg/ml (intervalo: 1.1 – 3.9 pg/ml), significativamente menor en comparación con la concentración en los grupos de LED y LECS. No hubo diferencias significativas entre ambos subtipos de LEC y los sujetos con cicatriz hipertrófica. (Tabla 4a y 4b, Figura 16)

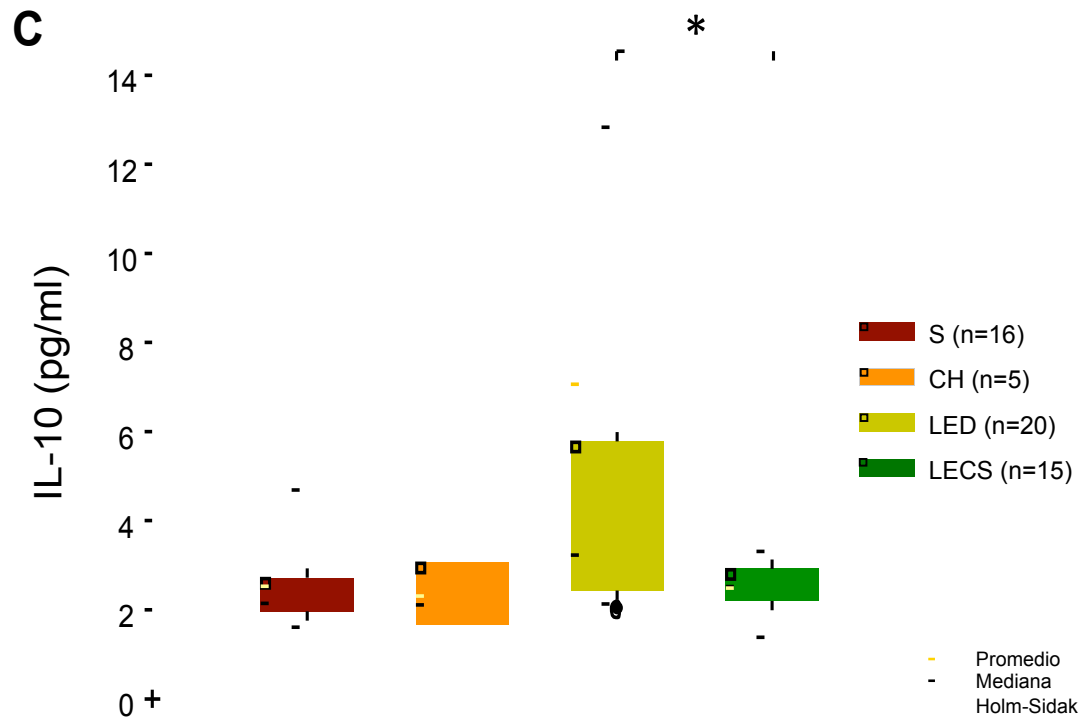
Figura 16



La mediana de la concentración sérica de **IL-10** en los pacientes con LED fue de 3.2 pg/ml (intervalo: 2.0 – 51.9 pg/ml) mientras que en pacientes con LECS fue 2.5 pg/ml (intervalo: 1.1 – 3.5 pg/ml), siendo la diferencia entre ambos grupos significativa $P=0.05$.

No hubo diferencias significativas entre las concentraciones séricas de los pacientes con LEC, la de los controles sanos (mediana 2.1 pg/ml, intervalo: 1.6 -5.4 pg/ml) y con cicatriz hipertrófica (mediana: 2.1 pg/ml, intervalo: 1.6 – 3.5 pg/ml) (Tabla 4a y 4b, Figura 17)

Figura 17



Correlación de Poblaciones Celulares y la Escala de CLASI en Lupus Cutáneo (LEC).

Se encontró una correlación negativa entre la puntuación de actividad mediante el CLASI y el porcentaje de células Th22 en la epidermis y dermis evaluadas mediante inmunohistoquímica (*Rho de Spearman*: -0.464 $p < 0.001$; y -0.494 $p < 0.001$; respectivamente); así como con el porcentaje de células Th22 circulantes evaluadas mediante citometría de flujo (*Rho de Spearman*: -0.355 $p < 0.043$).

Encontramos una correlación positiva entre la puntuación de actividad de CLASI y el porcentaje de células Treg circulantes (*Rho de Spearman*: +0.45 $p = 0.009$).

El resto de las correlaciones no fueron significativas.

Correlación de poblaciones celulares en tejido y circulantes.

En el grupo de pacientes con LEC, el porcentaje de células en tejido IL-22+ tuvo una correlación positiva con el porcentaje de células CD4+/CD161-/IL-22+ circulantes (*Rho de Spearman*: 0.665 $p < 0.001$); de igual manera que el porcentaje de células en tejido y circulantes Th1 (*Rho de Spearman*: 0.436 $p = 0.13$), y de células pDCregs (*Rho de Spearman*: 0.611 $p < 0.001$).

El resto de las correlaciones no fueron significativas.

VIII. DISCUSIÓN

=

El término 'lupus eritematoso cutáneo' (LEC) es una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica con manifestaciones clínicas heterogéneas confinadas principalmente a la piel, comprende varios trastornos relacionados al LEG, los cuales se definen como manifestaciones "específicas" del LEC.

El espectro de presentación clínica del LEC es amplio, va desde eritema leve hasta extensas placas diseminadas que dejan cicatrices y deformidad. La heterogeneidad del LEC (o subgrupos de enfermedad) contribuye a la dificultad de entender su patogénesis.

Con el objetivo de conocer la fisiopatología del LEC, se han publicado estudios que demuestran el papel de algunas citocinas y moléculas de adhesión, pero con resultados contradictorios.

El LED es el subtipo más frecuente de LEC, puede estar localizado en la cabeza o diseminarse al tórax, brazos y piernas. Histológicamente, las lesiones presentan paraqueratosis e hiperqueratosis folicular, dermatitis de interfase, infiltrado inflamatorio denso y profundo con afección perivascular y perianexial y depósitos de mucina. Dichas lesiones dejan secuelas como cicatrices, atrofia, hiper o hipopigmentación.³⁻⁴

El LECS es la segunda variedad más frecuente de LEC, se caracteriza por ser lesiones altamente fotosensibles, se presenta principalmente en cuello, tórax, hombros y brazos. Son placas anulares, eritematosas, papuloescamosa o psoriasiformes y las lesiones se curan sin dejar cicatriz. Histológicamente, muestran hiperqueratosis leve, epidermis atrófica, dermatitis de interfase leve e infiltrado inflamatorio en dermis superficial.³⁻⁴

La patogénesis del LEC es compleja, multifactorial y poco definida. Por ello, este trabajo evaluó la presencia de algunas subpoblaciones celulares productoras de diversas citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias así como poblaciones celulares reguladoras en las variedades LECS y LED, subtipos frecuentes de LEC.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la participación de las células Th22 las cuales conforman una subpoblación de células CD4⁺ T cooperadoras que se diferencian a partir de células T vírgenes en respuesta a TNF- α e IL-6, y se caracterizan por la secreción de IL-22 pero no de IL-17 o IFN- γ . Las células Th22 también producen IL-26 e IL-13 además de IL-22; siendo IL-22 la citocina funcional más relevante cuyo papel es importante en la proliferación y supervivencia celular así como en la producción de péptidos antibacterianos²⁷, por lo que participa en la inmunidad y la remodelación de los epitelios²⁸.

La expresión anormal de las células Th22 se ha observado en sangre periférica de pacientes con enfermedades autoinmunes como psoriasis, esclerosis sistémica y artritis reumatoide. Hasta el momento se considera que su participación en diferentes

tejidos es paradójica, ya que puede tener un comportamiento inflamatorio o anti-inflamatorio.^{21,27}

La relación de las células Th22 con la actividad del LEG es incierta. Así por ejemplo, un estudio mostró correlación positiva entre la presencia de IL-22 y la actividad global de la enfermedad evaluada por SLEDAI²⁹. En contraste, Pen y cols. no encontraron asociación entre los niveles séricos de IL-22 y la actividad de la enfermedad²¹. Otros autores como Cheng y cols. describieron una correlación negativa entre la actividad de la enfermedad y la presencia de IL-22 sérica²². Otro estudio que evaluó pacientes con LEG de reciente diagnóstico y vírgenes a tratamiento con esteroides e inmunosupresores, se encontró que los niveles plasmáticos de IL-22 estaban disminuidos pero que incrementaban en el seguimiento con la mejoría de los síntomas y el uso del tratamiento. Asimismo los niveles de IL-22 correlacionaron negativamente con el SLEDAI³⁰.

Por otra parte Yang y cols.³¹, buscaron la asociación de las células Th22 y niveles de IL-22 con afección específica a ciertos órganos. Este estudio encontró un incremento en niveles séricos de IL-22 y células circulantes Th22 en los sujetos con LEC, pero no en aquellos con nefropatía lúpica al compararlos con controles sanos. En dicho estudio, además se observó una correlación positiva entre los niveles séricos de IL-22 y células productoras Th22³¹. Sin embargo, no hubo diferencia entre los subtipos de LEC, ni determinación del número de células en el tejido afectado.

En el presente trabajo de investigación encontramos que el porcentaje de células Th22 en tejido, evaluado mediante inmunohistoquímica, fue significativamente mayor en ambos subtipos de LEC (LECS y LED) en comparación con piel sana; predominando tanto a nivel de la epidermis y dermis en lesiones de LED. Estos hallazgos son similares a los encontrados por citometría de flujo en relación al porcentaje de células Th22 circulantes, que de igual manera predominó en sujetos con LED. Asimismo documentamos una correlación positiva entre el porcentaje de células Th22 circulantes con el de dichas células en tejido y una correlación negativa de ambos porcentajes celulares (piel y sangre) con el puntaje de actividad cutánea evaluado con CLASI.

De manera opuesta los niveles séricos de IL-22 no correlacionaron con el porcentaje de células Th22 circulantes, ni en tejido. Los niveles séricos de IL-22 de

los pacientes con LECS fueron menores a los encontrados en sujetos sanos y los pacientes con LED. Lo anterior podría deberse a que esta subpoblación celular sintetiza y libera su contenido primordialmente en el tejido y no en la circulación.

Por lo que en relación a los hallazgos encontrados respecto a la participación de IL-22, que como se mencionó previamente puede tener función dual inflamatoria y/o anti-inflamatoria, consideramos que en los sujetos con LEC su acción predominante pudiera ser anti-inflamatoria e inductora de la reparación tisular.

Otra de las poblaciones celulares que estudiamos fue la Th17. En relación a las células Th17, cada vez hay más estudios en humanos y en modelos murinos³² que sugieren un papel dentro de la fisiopatología de LEG. Dicha población celular produce IL-17A que desempeña un papel pro-inflamatorio en enfermedades autoinmunes³³ a través de la regulación de quimiocinas y el reclutamiento de neutrófilos³⁴. La mayoría de los estudios en LEG han reportado niveles séricos elevados en comparación con los controles sanos^{12,13,22,35,36,37}. Más aún, algunos estudios han reportado una correlación entre los niveles de IL-17 y la actividad de la enfermedad^{32,35}, mientras que otros no lo han confirmado²².

En piel de pacientes con LECS y LED, la IL-17A se expresa en células endoteliales, fibroblastos y linfocitos; y se ha reportado una mayor concentración en pacientes con LED que en LECS¹⁸.

De igual forma Tanasescu C y cols., reportaron incremento de niveles séricos en sujetos con LED¹³. Por otra parte, los niveles séricos de IL-17A se han correlacionado positivamente con el número de células Th17⁺ en LED. Mientras que niveles séricos de IL-17F se han reportado incrementados en LED y LECS, sugiriendo que la heterogeneidad de las poblaciones de linfocitos Th17 pudiera estar implicada en el subtipo de LEC¹⁸. Finalmente se han reportado casos aislados con respuesta satisfactoria de LEC con inhibidores de IL-17 como el ustekinumab³⁸⁻³⁹.

En nuestro estudio encontramos un incremento de células Th17 en el tejido de sujetos con LED y LECS en comparación con lo observado en piel sana y en cicatriz hipertrófica; dicho incremento predominó en lesiones de LED. El porcentaje de células Th17 en sangre periférica, también predominó en sujetos con LED. Los niveles séricos de IL-17 fueron significativamente mayores en sujetos con LEC en

comparación con sujetos sanos, manteniendo predominio en el grupo de LED en comparación con LECS, tal y como fue reportado previamente por Tanasescu y cols.¹³ Sin embargo el incremento en los niveles séricos de IL-17 en dichos grupos no fue mayor a lo encontrado en sujetos con cicatrices hipertróficas.

Otra de las citocinas estudiadas fue el IFN- γ . El IFN- γ está involucrado en la inmunidad mediada por células y activación de macrófagos, defensa del huésped a patógenos intracelulares, respuesta celular de tipo Th1. En paralelo, el IFN- γ ejerce funciones reguladoras para limitar el daño tisular asociado a la inflamación, modula a las células T cooperadoras y la diferenciación de células T reguladoras (Tregs). Puede aumentar o suprimir la autoinmunidad y la patología asociada en un contexto o enfermedad de manera específica. Esta citocina es producida por las células NK durante la respuesta inmune temprana, y por células Th1 activadas durante la respuesta inmune adaptativa. En ratones, la presencia del IFN- γ demostró incrementar la velocidad de progresión de la enfermedad, y el tratamiento con anticuerpos anti-IFN- γ condujo a una remisión significativa⁴⁰. También se ha demostrado en modelos murinos que la delección del gen del IFN- γ y el de su receptor reduce la severidad de la enfermedad y prolonga la supervivencia^{41,42}. En humanos la mayoría de los estudios han demostrado que los pacientes con LEG tienen niveles elevados de IFN- γ asociados con actividad de la enfermedad⁴³⁻⁴⁵.

A nivel cutáneo, se ha determinado que la expresión transgénica del IFN- γ en la epidermis de ratones, origina enfermedad inflamatoria de la piel y síndrome lupus-like con presencia de anticuerpos antinucleares positivos⁴⁶.

Por otra parte, las quimiocinas CXCL10 y CXCL9, pertenecientes a la familia Th1, se encuentran sobre-expresadas en LEC predominantemente en pacientes con LECS *versus* LED⁴⁷. En nuestro trabajo evidenciamos expresión de células productoras de IFN- γ en tejido y a nivel periférico en ambas variedades de LEC, comparativamente mayor que en sanos; predominando en la variedad LED *versus* LECS. Aunque este hallazgo es de menor magnitud que la respuesta Th17 previamente descrita.

Por otra parte, la respuesta mediada por células Th2 se encuentra definida por la producción de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, la cual puede ser patogénica o protectora. La inmunidad tipo 2 promueve la respuesta contra helmintos, suprime la enfermedad

autoinmune mediada por células Th1, neutraliza las toxinas, mantiene la homeostasis metabólica, pero sobre todo regula la cicatrización, la regeneración tisular y la fibrosis⁴⁸. En cuanto a la respuesta Th2 mediada por IL-4 documentamos mayores porcentajes en ambos subtipos de LEC (LED y LECS) *versus* controles sanos. Aunque esta respuesta anti-inflamatoria fue de mucho menor magnitud que la mediada por IL-22. Además no hubo diferencia entre los subtipos de LEC estudiados. Previamente la respuesta Th2 en LEC ha sido descrita por incremento en la expresión de IL-6⁴⁹. Así por ejemplo una mayor expresión del ARNm de IL-6 se ha observado en la capa basal de queratinocitos de pacientes con LEC. En el presente trabajo también observamos la participación de la respuesta Th2 por IL-4 la cual fue significativamente mayor que en los controles sanos, pero similar a los casos de cicatrices hipertróficas, lo que probablemente se encuentra relacionado a procesos de reparación tisular y/o fibrosis.

En cuanto a las células con un papel regulatorio, estudiamos a las Tregs son un subtipo de linfocitos T CD4⁺ que tiene un papel crucial en el control de las enfermedades autoinmunes así como en el mantenimiento de la homeostasis después de la respuesta inmune, previniendo el desarrollo de inmunopatologías^{14,50}. Estas células son distinguidas por ser positivas para CD25 y expresar el factor de transcripción Foxp3, definido por diversos autores como el gen maestro controlador del desarrollo y función de las células T reguladoras y es considerado como el principal marcador molecular de esta subpoblación aunque también se han descrito otros marcadores asociados con su estado de maduración y actividad funcional como CD45RA, CTLA4, CD62L, CCR7, GITR y CD103. Estas células se pueden generar en el timo donde requieren la combinación de fuertes señales antigénicas así como una máxima coestimulación y reciben el nombre de células T reguladoras naturales (nTregs) y expresan FOXP3. Pero también se pueden generar en la periferia a partir de linfocitos T vírgenes después del encuentro con antígenos propios o externos, en condiciones de coestimulación limitante y en función de las citocinas presentes en el momento de la activación y reciben el nombre de células T reguladoras inducibles (iTregs). Las células Tregs pueden suprimir las respuestas inmunológicas en múltiples pasos: mediante la producción de granzimas y perforinas que induce citotoxicidad en las células T efectoras, por el consumo de IL-2 que es necesaria para la proliferación celular, la secreción de moléculas supresoras como IL-10 y TGF- β y/o a través de mecanismos dependientes de contacto celular atenuando la

funciones de las células presentadoras de antígenos (APC) que pueden promover energía u apoptosis en la células T efectora. Ambas sub-poblaciones de Tregs tienen la región TSDR del gen *Foxp3* desmetilada, por lo que comparten un patrón global de expresión génica similar, estabilidad y fenotipo, aunque sus mecanismos de supresión pueden diferir entre ambos subtipos, las iTregs suprimen principalmente vía producción de citocinas inhibitorias mientras que las nTreg usan el contacto celular para ejercer su supresión⁵⁰.

Varios grupos han analizado el número de células T_{reg} en pacientes con LEG y han descrito una disminución en la proporción celular en pacientes con enfermedad activa⁵²⁻⁵⁴.

También se ha observado una reducción significativa de las T_{reg} en correlación con la producción de autoanticuerpos y el inicio del síndrome lupus-like en diferentes modelos murinos^{55,56}. De igual forma Lee cols.⁵⁷, encontraron una disminución significativa de células T_{reg} en pacientes pediátricos con LEG, demostrando una correlación inversa entre el número de células y la actividad de la enfermedad, así como el nivel de autoanticuerpos.

En cuanto al LEC, en un estudio previo se reportó una baja prevalencia de esta población en lesiones cutáneas por lupus *versus* controles sanos. Y no se encontró diferencia entre los subtipos de LED, LECS y lupus tímido mientras que el número de células T_{reg} fue mayor en otras enfermedades inflamatorias de la piel como dermatitis atópica, psoriasis y liquen plano⁵⁸.

En el presente trabajo de investigación, documentamos un incremento en las células Treg circulantes y en tejido afectado en LED y LECS al compararlo con el grupo de controles sanos. Sin embargo, semejante a lo reportado en estudio de Franz B cols.,⁵⁸ fue menor el porcentaje de células Treg en ambos subgrupos de LEC en comparación con el grupo de sujetos con cicatrices hipertróficas.

Otra población celular implicada en el LEG, debido a la producción de autoanticuerpos, son las células B⁵⁹. No obstante, el concepto de células B supresoras ha resurgido en la última década. Son células que suprimen la respuesta inmune, incluyendo los procesos autoinmunes, las repuestas infecciosas exacerbadas y el cáncer. Las células Bregs poseen un fenotipo variable, sin embargo

en su mayoría son células inmaduras, transicionales T2, CD19⁺/CD24^{hi}/CD38^{hi} productoras de IL-10⁶⁰. La IL-10 es la principal citocina con efectos anti-inflamatorios, producida por células B activadas, y en menor cantidad por los monocitos y las células T CD4⁺ y CD8^{+16,17}. La participación de las células Bregs en la fisiopatogenia de lupus aún está en estudio.

En ratones susceptibles a desarrollar lupus, se han descrito niveles altos de IL-10 y la administración de anticuerpos anti-IL-10 retrasa el desarrollo de la enfermedad⁶¹. Estos resultados sugieren que la IL-10 contribuye a la patogénesis de LEG mediante la promoción de la producción de anticuerpos con la activación de células B. Sin embargo, los ratones knockout para IL-10 demostraron enfermedad grave, y la administración de IL-10 recombinante redujo dicha exacerbación de la enfermedad⁶². Otros estudios en humanos con LEG exhibieron un incremento en los niveles séricos de IL-10 que tienen correlación con la actividad de la enfermedad^{16,17, 63}.

En cuanto a su participación en LEC, Thorpe RB y cols.⁶⁴ reportaron depósitos de células B en lesiones de LED. Sin embargo, Tebbe cols.⁶⁵ y Lee cols.⁶⁶ no encontraron niveles mayores de células B productoras de IL-10 en lesiones de LED. En un estudio de citometría de flujo se documentó que la población de células Bregs se encuentra incrementada en pacientes con lesiones cutáneas de lupus y que esta expansión fue mayor al comparar pacientes activos *versus* inactivos. Incluso mostraron una correlación positiva entre la población Bregs y el valor de SLEDAI. Este mismo estudio también evaluó 10 biopsias de piel de los mismos pacientes con LEC, encontrando la presencia de células B productoras de IL-10⁺ por inmunohistoquímica y por inmunofluorescencia.⁶⁷

En este proyecto no encontramos diferencia en la expresión de células CD20⁺/IL-10⁺ en el grupo de pacientes con LEC en comparación con los controles sanos ni cicatrices hipertróficas, tal como describen Tebbe y Lee^{65,66}. Sin embargo, si se observó una tendencia al incremento en el porcentaje de células Bregs en las biopsias de los pacientes con LEC, principalmente en los pacientes con LED. Por otro lado, el porcentaje de células B CD19⁺/CD24^{hi}/CD38^{hi}/IL-10⁺ circulantes, fue mayor en los pacientes con LED *versus* los individuos sanos y los pacientes con LECS. No se determinó correlación con la actividad de la enfermedad.

Finalmente se conoce que las células dendríticas plasmacitoides reguladoras (pDCregs) son una subpoblación que expresan 2,3-dioxigenasa de indolamina (IDO), una enzima que participa en el metabolismo del triptófano, suprime la actividad de células T efectoras e induce la polarización de células Tregs. IDO es regulada positivamente durante la presentación antigénica y la unión de CTLA-4/B7·1/B7·2 (CD80/CD86) en los linfocitos y células dendríticas; en respuesta a la infección y a la presencia de ácidos nucleicos circulantes a través de la activación del TLR4 y TLR9; y por la inflamación tisular (TNF- α , PGE₂, IFN- $\alpha/\beta/\gamma$)⁶⁸ y son reguladoras críticas de la inmunidad adaptativa contribuyendo a la supresión del proceso inflamatorio.

Solo existe en estudio donde se ha reportado mayor frecuencia de esta población en pacientes con LEC *versus* piel normal.⁶⁹ Tomasini y cols. demostraron que la presencia de pDCs en biopsias de pacientes con lupus cutáneo tienden a formar pequeños agregados nodulares, en comparación con las biopsias de pacientes con psoriasis y liquen en donde se encontraron de forma aislada. Asimismo describieron una distribución superficial en el LED⁷⁰. En lupus cutáneo, las células pDCs producen IFN tipo I en respuesta a antígenos nucleares, inmunocomplejos y luz UV. A su vez el IFN tipo I incrementa el reclutamiento leucocitario mediante la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión⁷¹.

En nuestro estudio encontramos que el porcentaje de células CD123⁺ que expresan IDO, tanto en tejido afectado como circulantes, fue mayor en el grupo de LED en comparación con controles sanos y el grupo de LECS, correlacionado el porcentaje de células a nivel sérico con el número de células en tejido.

Las cicatrices hipertróficas presentaron un porcentaje elevado de células pDCregs en comparación con las biopsias de individuos sanos y los pacientes con LED y LECS.

Con base en nuestros resultados podemos concluir que la piel es un órgano inmunogénico capaz de generar una respuesta celular T ante diversos estímulos. En el caso de LEC observamos un predominio de la respuesta por Th17 y Th22, aunque en menor medida también se documentó una respuesta Th1 y Th2. En general, nuestros resultados refuerzan que el estado inflamatorio de pacientes con LEC se caracteriza por un aumento en el número de células Th17 a nivel cutáneo y

sugiere su participación en los procesos pro-inflamatorios, por otra parte documentamos incremento de las células Th22 cuyo papel es aún controversial. Sin embargo, nuestros hallazgos sugieren que esta población celular tiene un papel potencial como regulador negativo o anti-inflamatorio y como inductor de la reparación tisular en el LEC. En cuanto a las células inmunoregulatoras la mayor participación en relación al porcentaje estuvo dado por las pDCregs y en menor grado por las T_{regs}.

También observamos que si bien ambas variedades de LEC (LED y LECS) tuvieron un comportamiento similar en cuanto a las poblaciones celulares estudiadas al compararlas con controles; la respuesta en LED siempre fue de mayor intensidad. Por otra parte, en un reporte previo se ha señalado una mayor expresión de ARNm para el INF- γ , TNF- α , TGF- β 1, IL-6, IL-10, IL12p40, CXCL9 y CXCL10 en la variedad LECS *versus* LED⁷².

Un punto importante y que debe de tomarse en cuenta para la interpretación y contextualización de los resultados obtenidos en el estudio, en función de los datos publicados es el tratamiento recibido por los pacientes. El tratamiento estándar en lupus es a base de glucocorticoides (GCs) y agentes inmunosupresores. Los GCs siguen siendo la piedra angular del tratamiento y tienen acción directa en la polarización de las células Th1, lo que modifica el balance y perfil de citocinas Th1/Th2⁷³. Por otra parte, la hidroxicloroquina ha demostrado inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias derivadas de macrófagos y la presentación antigénica, aunque los efectos potenciales sobre las células T permanecen poco claros⁷⁴. De tal suerte que las diferencias en los niveles de citocinas y subpoblaciones celulares encontradas en nuestro estudio con respecto a lo previamente reportado, bien podrían deberse al tratamiento aplicado en la población de estudio.

IX. CONCLUSIONES

-

En conclusión, en el presente estudio encontramos un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células Th22, Th17 y Th1 en los pacientes con LED *versus* los de LECS. El número de células pDCregs y en menor grado las Tregs pero no de las Bregs en los pacientes con LED presentaron un incremento estadísticamente significativo *versus* los pacientes con LECS. Nuestros resultados sugieren que el balance entre las subpoblaciones de células pro- y anti-inflamatorias favorece a la primera, con la incapacidad de la última de mantener la homeostasis.

Nuestros resultados contribuyen a elucidar el papel de diversas poblaciones celulares y citocinas en la fisiopatogenia del LED y del LECS. Un conocimiento más profundo de estas redes de citocinas y células permitirá el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas más específicas para esta patología.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Heinlen L, McClain M, Merrill J, et al. Clinical criteria for systemic lupus erythematosus precede diagnosis, and associated autoantibodies are present before clinical symptoms. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2344–51.
2. Tebbe, B, Orfanos, CE. Prognosis of cutaneous lupus erythematosus. In: Kuhn, A, Lehmann, P, Ruzicka, T, (eds), *Cutaneous lupus erythematosus*. Berlin (Heidelberg, New York): Springer; 2004. p. 187–204.
3. Gilliam, J. The cutaneous signs of lupus erythematosus. *Cont Educ Fam Phys* 1977; 6: 34–70.
4. Obermoser G Sontheimer R, Zelger B. Overview of common, rare and atypical manifestations of cutaneous lupus erythematosus and histopathological correlates. *Lupus* 2010;19:1050-70.
5. Dutz J, Sontheimer R, Werth V. Pathomechanisms of Cutaneous Lupus Erythematosus. In: Dubois' *Lupus Erythematosus*. Wallace D, Hamahs Bevra Ed. Lippincott Williams & Wilkins 2007;29:552-75.
6. Oh S, Roh H, Kwon J, et al. Expression of interleukin-17 is correlated with interferon- α expression in cutaneous lesions of lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol* 2011; 36:512-20.
7. Nürnberg W, Haas N, Scahdendorf D, Czarnetzki B. Interleukin-6 expression in the skin of patients with lupus erythematosus. *Exp Dermatol* 1995; 4:52-7.
8. Stein L, Saed G, Fivenson D. T cell cytokine network in cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36:191-6.
9. Toro J, Finlay D, Dou X, Zheng S, LeBoit P, Connolly M. Detection of type 1 cytokines in discoid lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 2000; 136:1497-501
10. Carneiro J, Fuzii H, Kayser C, et al. IL-2, IL-5, TNF- α and IFN- γ mRNA expression in epidermal keratinocytes of systemic lupus erythematosus skin lesions. *Clinics* 2011;66:77-82.

11. Wang D, Drenker M, Eiz-Vesper B. Evidence for a pathogenetic role of interleukin-18 in cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008; 58:3205-15.
12. Wong C, Lit L, Tam L, Li E. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in autoimmunity. *J Autoimmun* 2008;31:79-89.
13. Tanasescu C, Balancescu E, Balanescu P, Olteanu R., Badea C., Grancea C. IL-17 in cutaneous lupus erythematosus. *Eur J Intern Med* 2010; 21: 202-7
14. Franz A, Fritszching B, Riehl A, et al. Low number of regulatory T cells in skin lesions of patients with cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007; 56;56:1910-20.
15. Hofmann S, Rösen-Wolff A, Tsokos G, Hedrich C. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. *Clin Immunol.* 2012 ;143:116-27.
16. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R. Monocytes and T lymphocytes contribute to a predominance of interleukin 6 and interleukin 10 in systemic lupus erythematosus. *Cytometry B Clin Cytom* 2009; 76B: 261–270.
17. Chun HY, Chung JW, Kim HA, Yun JM, Jeon JY, Ye YM, Kim SH, Park HS, Suh CH. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 2007; 27: 461–466.
18. Mikita N, Ikeda T, Ishiguro M, Furkawa F. Recent advances in cytokines in cutaneous and systemic lupus erythematosus. *J Dermatol* 2011; 38: 839-49.
19. Yoshimasu T, Nichide T, Seo N, et al. Susceptibility of T cell receptor alpha chain knock-out mice to ultraviolet B light and fluoracil: a novel model for drug-induced cutaneous lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2004; 136:245-54.
20. Izuhara K, Arima K, Yasunaga S. IL-4 and IL-13: their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies. *Current drug targets. Inflammation and allergy* 2003; 1 : 263–9.

21. Pan H, Zhao X, Yuan H. Decreased serum IL-22 levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Chin Acta* 2009; 401:179-80.
- 22.- Cheng F., Guo Z., Xu H., Yan D., Li Q., Decreased plasma IL-22 levels but not increased IL-17 and IL-23 levels correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:604-6.
- 23.- Albrecht J, Taylor L, Berlin J, et al. The CLASI (Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity index): an outcome instrument for cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 2005; 125:889-94
24. Furuzawa-Carballeda J, Sánchez-Guerrero J, Betanzos JL, Enriquez AB, Avila-Casado C, Llorente L, Hernández-Molina G. Differential Cytokine Expression and Regulatory Cells in Patients with Primary and Secondary Sjögren's Syndrome. *Scand J Immunol* 2014; 80:432-440.
25. Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Jakez-Ocampo J, Llorente L. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-expressing peripheral cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Eur J Clin Invest* 2011;41:1037-46.
26. Simera I, Moher D, J Hoey, Schulz KF, y Altman DG. Un catálogo de la notificación de directrices para la investigación en salud. *Eur J Clin Invest* 2010; 40: 35-53
27. Nikoopour E, Bellemore S, Singh B. IL-22 cell regeneration and autoimmunity. *Cytokine* 2014; 29 pii: S1043-4666(14)00535-3
28. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009;119:3573-85
29. Qin W, Chen L, Pan H, cols. Expression of IL-22 in circulating CD4+/CD8+ T cells and their correlation with disease activity in SLE patients. *Clin Exp Med* 2011; 11:245-50

30. Lin J, Yue H, Chen W. Decreased plasma IL-22 levels and correlations with IL-22 producing T helper cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2014;79:131-6.
31. Yang X, Wang H, Zhao X, Wang L, Lv Q, Wang Q. Th22, but not Th17 Might be a Good Index to Predict the Tissue Involvement of Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Immunol* 2013; 33(4):767-74.
32. Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, cols. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol*. 2008;9:166–75.
33. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun*. 2008;31:252–6.
34. Ivanov S, Lindén A. Interleukin-17 as a drug target in human disease. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 95– 103.
35. Chen X.Q., Yu Y.C., Deng H.H., Sun J.Z., Dai Z., Wu Y.W. Plasma IL-17A is increased in new-onset SLE patients and associated with disease activity, *J. Clin. Immunol*. 30 (2010) 221–225.
36. Zhao F., Pan H., Yuan H., Zhang WH, Li X.P., Wang G.H, Increased serum interleukin 17 in patients with systemic lupus erythematosus, *Mol. Biol. Rep.* 2010; 3781–85.
37. Vincent F.B., Northcott M., Hoi A., Mackay F., Morand E.F., Clinical associations of serum interleukin-17 in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Res. Ther.* 2013;15 R97.
38. Souza A, Ali-Shaw T, Strober B, Franks A. Successful Treatment of Subacute Lupus Erythematosus With Ustekinumab. *Arch Dermatol*. 2011;147(8):896-898
39. Dahl C, Johansen C, Kragballe K, Olesen A. Ustekinumab in the Treatment of Refractory Chronic Cutaneous Lupus Erythematosus: A Case Report. *Acta Dermato-Venereologica*; 2013 (93); 368-369
40. Jacob CO, Van der Meide PH, McDevitt HO. In vivo treatment of (NZB X NZW) F1

lupus-like nephritis with monoclonal antibody to gamma interferon. *J Exp Med* 1987; 166: 798–803.

41. Haas C, Ryffel B, Le Hir M. IFN-gamma receptor deletion prevents autoantibody production and glomerulonephritis in lupus-prone (NZB x NZW)F1 mice. *J Immunol* 1998; 160: 3713–3718.

42. Balomenos D, Rumold R, Theofilopoulos AN. Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J Clin Invest* 1998; 101: 364–371.

43 al-Janadi M, al-Balla S, al-Dalaan A, Raziuddin S. Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases. *J Clin Immunol* 1993; 13: 58–67.

44. Akahoshi M, Nakashima H, Tanaka Y cols. Th1 / Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1644– 1648.

45. Calvani N, Tucci M, Richards HB, Tartaglia P, Silvestris F. Th1 cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis: the role of IL-18. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 542–548.

46. Seery JP, Carroll JM, Cattell V, Watt FM. Antinuclear autoantibodies and lupus nephritis in transgenic mice expressing interferon gamma in the epidermis. *J Exp Med* 1997; 186: 1451–1459.

47. Freutel S, Gaffal E, Zahn S, Bieber T, Tüting T, Wenzel J. Enhanced CCR5+/CCR3+ T helper cell ratio in patients with active cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 2011; 12: 1300-4.

48. Wynn T. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nat Rev Immunol*, 2015;15(5):271-82.

49. Makol A1, Gibson LE, Michet CJ. Successful use of interleukin 6 antagonist tocilizumab in a patient with refractory cutaneous lupus and urticarial vasculitis. *J Clin Rheumatol*. 2012;18(2): 92-5.

50. Burrell BE, Nakayama Y, Xu J, Brinkman CC, Bromberg JS. Regulatory T cell induction, migration, and function in transplantation. *J Immunol*. 2012; 189 (10): 4705-

11.

51. Crispin, JC, Martinez, A. Alcocer-Varela, J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2003; 21: 273–276.

52. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, Tutor-Ureta P, Yebra-Bango M, Andreu JL, Vargas JA. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus.. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 553–554.

53. Lyssuk, EY, Torgashina, AV, Soloviev, SK, Nasonov, EL, Bykovskaia, SN. Reduced number and function of CD4+CD25high- FoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol* 2007; 601: 113–119.

54. Valencia, X, Yarboro, C, Illei, G, Lipsky, PE. Deficient CD4+ CD25 high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2007; 178: 2579–2588.

55. Wu HY, Staines NA. A deficiency of CD4+CD25+ T cells permits the development of spontaneous lupus-like disease in mice, and can be reversed by induction of mucosal tolerance to histone peptide autoantigen. *Lupus* 2004; 13: 192–200.

56. Monk CR1, Spachidou M, Rovis F, Leung E, Botto M, Lechler RI, Garden OA. MRL/Mp CD4+,CD25- T cells show reduced sensitivity to suppression by CD4+,CD25+ regulatory T cells in vitro: a novel defect of T cell regulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(4): 1180-4.

57. Lee, JH, Wang, LC, Lin, YT, Yang, YH, Lin, DT, Chiang, BL. Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2006; 117: 280–286.

58. Franz, B., Fritzsching, B., Riehl, A., Oberle, N., Klemke, C.D., Sykora, J. et al. Low number of regulatory T cells in skin lesions of patients with cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 1910– 1920.

59. Ahmed S1, Anolik JH. B-cell biology and related therapies in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010; 36(1):109-30

60. Mauri C, Blair P. Regulatory B cells in autoimmunity: developments and

controversies. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:636-43

61. Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S, Andrade S, Menon S, Howard M. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Exp Med* 1994; 179: 305–310.

62. Yin Z, Bahtiyar G, Zhang N, Liu L, Zhu P, Robert ME, McNiff J, Madaio MP, Craft J. IL-10 regulates murine lupus. *J Immunol* 2002; 169: 2148–2155.

63. Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg I. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18(5):565–70.

64. Thorpe RB, Gray A, Kumar KR, Susa JS, Chong BF. Site-specific analysis of inflammatory markers in discoid lupus erythematosus skin. *ScientificWorldJournal*. 2014:925805.

65. Tebbe B., Mazur L., Stadler DR., Orfanos CE. Immunohistochemical analysis of chronic discoid and subacute cutaneous lupus erythematosus-relation to immunopathological mechanisms. *Br J Dermatol*. 1995;132(1):25-31.

66. Lee M., Wilkinson B., Doyle J. A., Kossard S. A comparative immunohistochemical study of lichen planus and discoid lupus erythematosus, *Australasian Journal of Dermatology*, 1996; 37 (4):188–192

67. Yang X, Yang J, Chu Y, Xue Y, Xuan D, Zheng S, Zou H. T follicular helper cells and regulatory B cells dynamics in systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2014 Feb 14;9(2):e88441.

68. Popov A, Schultze J. IDO-expressing Regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J Mol Med* 2008;86:145-60.

69. Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnse FL. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol*. 2001;159(1):237-43.

70. Tomasini D, Mentzel T, Hantschke M, Ceri A, Paredes B, cols. Plasmacytoid dendritic cells: an overview of their presence and distribution in different inflammatory

skin diseases, with special emphasis on Jessner's lymphocytic infiltrate of the skin and cutaneous lupus erythematosus. *J Cutaneous Pathol* 2010; 37:1132-39

71. Robinson E, Werth V. The role of cytokines in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Cytokine* 2015. En prensa

72. Gambichler T, Genc Z, Skrygan M, Scola N, Tigges C, Terras S, cols. Cytokine and chemokine ligand expression in cutaneous lupus erythematosus. *Eur J Dermatol* 2012;22:319-23.

73. Guo C, Chu X, Shi Y, He W, Li L, Wang L, Wang Y, Peng J, Hou M. Correction of Th1-dominant cytokine profiles by high-dose dexamethasone in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Clin Immunol.* 2007;27(6):557-62

74. Zhao L, Ma H, Jiang Z, Jiang Y, Ma N. Immunoregulation therapy changes the frequency of interleukin (IL)-22+CD4+ T cells in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol*, 2014; 177:212-8

Tabla 2a. Expresión de Citocinas y Células Regulatoras en biopsias de Piel (Inmunohistoquímica)

	Epidermis				Dermis			
	S	CH	LED	LECS	S	CH	LED	LECS
	(n=16)	(n=5)	(n=20)	(n=15)	(n=16)	(n=5)	(n=20)	(n=15)
IL-22(% de células)								
Media ± SEM	5.7 ± 0.7	15.6 ± 0.5	23.4 ± 2.1	16.1 ± 1.8	4.7 ± 1.0	17.3 ± 0.8	28.9 ± 2.5	17.0 ± 1.9
Mediana	5.0	16.0	21.0	16.0	3.0	17.5	28.0	19.0
Intervalo	2.0 – 10.5	14.0 – 18.0	7.0 – 49.0	2.0 – 55	1.0 – 14.0	15.0 – 22.0	8.0 – 55.0	7.0 – 31.0
IL-17A/ CD4⁺(% de células)								
Media ± SEM	2.8 ± 0.5	5.0 ± 0.7	27.1 ± 1.8	11.9 ± 1.5	2.1 ± 0.5	4.1 ± 0.5	29.53 ± 1.8	12.4 ± 1.1
Mediana	2.0	5.0	24.0	13.0	2.0	4.5	28.50	13.5
Intervalo	1.0 – 8.0	2.0 – 8.0	19.0 – 44.0	3.0 – 21.0	0.0 – 7.0	1.0 – 6.0	20.0 – 50.0	4.0 – 18.0
IL-4/CD4⁺(% de células)								
Media ± SEM	3.0 ± 0.9	8.5 ± 0.9	12.6 ± 1.4	11.0 ± 1.1	3.2 ± 0.9	13.8 ± 0.5	12.3 ± 1.3	11.8 ± 1.5
Mediana	2.0	9.0	12.0	10.5	2.5	14.0	13.0	11.0
Intervalo	0.5 – 15.0	3.0 – 14.0	4.0 – 25.0	5.5 – 18.0	0.0 – 13.0	12.0 – 17.0	1.5 – 21.0	4.0 – 22.0
IFN-γ/CD4⁺(% de células)								
Media ± SEM	2.2 ± 0.5	7.5 ± 0.8	11.0 ± 0.8	8.0 ± 1.4	2.5 ± 0.7	9.0 ± 0.5	11.3 ± 0.7	7.7 ± 1.1
Mediana	2.0	8.0	10.0	6.0	2.0	9.0	11.0	6.0
Intervalo	0.0 – 6.0	2.0 – 11.0	4.5 – 18.0	2.5 – 22.0	0.0 – 9.0	7.0 – 12.0	0.5 – 18.0	3.5 – 16.0

Foxp3/CD25⁺ (% de células)

Media ± SEM	5.4 ± 1.0	45.9 ± 1.1	14.8 ± 1.1	12.5 ± 1.2	5.4 ± 1.2	55.1 ± 0.8	17.8 ± 1.1	15.0 ± 1.1
Mediana	5.0	45.5	16.0	12.0	3.0	56.0	17.5	15.0
Intervalo	1.0 – 14.0	40.0 – 52.0	3.5 – 23.0	7.0 – 24.0	0.5 – 15.0	50.0 – 58.0	11.0 – 27.0	9.0 – 22.0

IL-10/CD20⁺ (% de células)

Media ± SEM	7.3 ± 1.2	11.4 ± 0.6	10.9 ± 0.8	8.9 ± 1.4	8.8 ± 1.5	16.7 ± 0.8	12.9 ± 1.2	12.3 ± 1.3
Mediana	5.5	10.5	10.5	8.0	6.5	16.0	13.0	11.3
Intervalo	2.0 – 15.0	9.0 – 14.0	3.0 – 18.0	1.0 – 15.5	2.0 – 20.0	13.0 – 22.0	1.5 – 23.0	6.0 – 24.0

IDO/CD123⁺ (% de células)

Media ± SEM	4.0 ± 0.7	17.1 ± 1.6	9.9 ± 0.9	5.0 ± 1.0	4.0 ± 0.5	20.7 ± 1.2	12.7 ± 1.2	8.2 ± 0.9
Mediana	4.0	16.0	8.5	4.0	4.0	20.0	11.0	8.0
Intervalo	1.0 – 11.0	12.0 – 26.0	4.0 – 18.0	1.0 – 12.0	1.0 – 8.0	16.0 – 26.0	4.5 – 29.0	4.0 – 16.0

S: Donadores Sanos; **CH:** Cicatriz Hipertrófica; **LED:** Lupus Eritematoso Discoide; **LECS:** Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo

Tabla 2b. Valores de *P* en la Expresión de Citocinas y Células Reguladoras en biopsias de Piel (Inmunohistoquímica)

	IL-22		CD4/IL-17A		CD4/IL-4		CD4/IFN- γ		CD25/Foxp3		CD20/IL-10		CD123/IDO	
	Epidermis	Dermis	Epidermis	Dermis	Epidermis	Dermis	Epidermis	Dermis	Epidermis	Dermis	Epidermis	Dermis	Epidermis	Dermis
S vs. CH	0.002	<0.001	NS	NS	0.008	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	NS	0.002	<0.001	<0.001
S vs. LED	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	NS	<0.001	<0.001
S vs. LECS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	NS	NS	0.007
CH vs. LED	0.008	<0.001	<0.001	<0.001	NS	NS	0.043	NS	<0.001	<0.001	NS	NS	<0.001	<0.001
CH vs. LECS	NS	NS	0.01	<0.001	NS	NS	NS	NS	<0.001	<0.001	NS	NS	<0.001	<0.001
LED vs. LECS	0.007	<0.001	<0.001	<0.001	NS	NS	0.036	0.004	NS	NS	NS	NS	0.002	0.004

S: Donadores Sanos; **CH:** Cicatriz Hipertrófica; **LED:** Lupus Eritematoso Discoide; **LECS:** Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo

Tabla3a. Expresión de Citocinas y Células Reguladoras Circulantes en pacientes con Lupus cutáneo y controles

	S (n=16)	CH (n=5)	LED (n=20)	LECS (n=15)
CD3⁺/CD4⁺/CD161⁺/IL-22⁺ (% de células)				
Media ± SEM	2.4 ± 0.1	6.0 ± 0.8	12.4 ± 0.4	10.5 ± 0.3
Mediana	2.8	5.9	12.1	10.3
Intervalo	1.5 – 3.0	4.4 – 8.9	10.2 – 15.2	9.5 – 12.5
CD3⁺/CD4⁺/CD161⁺/IL-17A⁺ (% de células)				
Media ± SEM	2.1 ± 0.1	6.0 ± 0.4	10.3 ± 0.3	5.2 ± 0.4
Mediana	2.2	6.4	10.3	4.7
Intervalo	1.1 – 2.8	4.3 – 6.7	8.5 – 11.9	3.9 – 9.0
CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/IL-4⁺ (% de células)				
Media ± SEM	2.0 ± 0.1	8.4 ± 0.6	6.6 ± 0.3	7.1 ± 0.2
Mediana	2.1	8.6	6.9	7.3
Intervalo	1.2 – 2.9	6.2 – 9.6	4.6 – 8.8	5.5 – 8.4
CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/IFN-γ⁺ (% de células)				
	1.9 ± 0.2	5.6 ± 0.6	9.0 ± 0.2	7.0 ± 0.2

Media ± SEM				
Mediana	1.7	6.1	8.7	6.8
Intervalo	1.1 – 3.0	3.2 – 6.8	8.0 – 10.9	6.1 – 8.4
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ^{hi} /Foxp3 ⁺ (% de células)				
Media ± SEM	5.7 ± 0.2	10.1 ± 0.3	8.1 ± 0.2	8.3 ± 0.3
Mediana	5.6	10.4	8.3	8.5
Intervalo	4.3 – 7.3	9.5 – 10.7	5.5 – 9.3	6.6 – 9.8
CD19 ⁺ /CD24 ^{hi} /CD38 ^{hi} /IL-10 ⁺ (% de células)				
Media ± SEM	10.3 ± 0.3	12.1 ± 1.1	12.9 ± 0.4	10.8 ± 0.4
Mediana	10.0	10.8	13.0	10.3
Intervalo	7.8 – 12.5	9.8 – 15.5	10.4 – 14.8	9.1 – 13.0
CD123 ^{hi} /CD196 ⁺ /IDO ⁺ (% de células)				
Media ± SEM	18.6 ± 0.4	19.0 ± 0.9	33.2 ± 0.7	23.4 ± 0.7
Mediana	18.4	18.6	32.3	22.6
Intervalo	15.2 – 22.4	17.0 – 21.9	28.5 – 39.0	20.0 – 27.1

S: Donadores Sanos; **CH:** Cicatriz Hipertrófica; **LED:** Lupus Eritematoso Discoide; **LECS:** Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo

Fluorescence activated cell scarter (FACSCalibur) de Becton-Dickinson

Tabla 3b. Valores de *P* en la Expresión de Citocinas y Células Reguladoras Circulantes en Pacientes con Lupus Eritematoso

	CD4 ⁺ /CD161 ⁻	CD4 ⁺ /CD161 ⁺	CD4 ⁺ /CD25 ⁺	CD4 ⁺ /CD25 ⁺	CD4 ⁺ /CD25 ^{hi}	CD19 ⁺ /CD38 ⁺	CD123 ^{hi} /CD196 ⁺
	/IL-22 ⁺	/IL-17A ⁺	/IL-4 ⁺	/IFN-γ ⁺	/Foxp3 ⁺	/CD24 ⁺ /IL-10 ⁺	/IDO ⁺
S vs. CH	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.043	NS
S vs. LED	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
S vs. LECS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	<0.001
CH vs. LED	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	NS	<0.001
CH vs. LECS	<0.001	NS	0.028	0.003	0.002	NS	0.004
LED vs. LECS	<0.001	<0.001	NS	<0.001	NS	0.001	<0.001

S: Donadores Sanos; **CH:** Cicatriz Hipertrófica; **LED:** Lupus Eritematoso Discoide; **LECS:** Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo

Tabla 4a. Niveles de Citocinas en Suero de Pacientes con Lupus Eritematoso (ELISA)

	S (n=16)	CH (n=5)	LED (n=20)	LECS (n=15)
IL-22 (pg/ml)				
Media ± SEM	229.0 ± 28.1	38.5 ± 2.2	211.8 ± 53.1	96.6 ± 16.3
Mediana	211.2	37.5	126.4	101.9
Intervalo	106.3 – 517.5	32.2 – 45.2	85.8 – 955.5	34.4 – 249.9
IL-17A (pg/ml)				
Media ± SEM	2.2 ± 0.2	6.5 ± 1.8	5.8 ± 0.4	4.5 ± 0.4
Mediana	2.0	8.1	5.3	4.5
Intervalo	1.1 – 3.9	0.9 – 10.0	3.4 – 10.4	2.3 – 6.8
IL-10 (pg/ml)				
Media ± SEM	2.5 ± 0.3	2.3 ± 0.4	7.1 ± 2.6	2.5 ± 0.2
Mediana	2.1	2.1	3.2	2.5
Intervalo	1.6 – 5.4	1.6 – 3.5	2.0 – 51.9	1.1 – 3.5

S: Donadores Sanos; **CH:** Cicatriz Hipertrófica; **LED:** Lupus Eritematoso Discoide; **LECS:** Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo
ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: 'Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas')

Tabla 4b. Valores de *P* en los Niveles de Citocinas en Suero de Pacientes con Lupus Eritematoso

	IL-22	IL-17A	IL-10
S vs. CH	0.05	0.05	NS
S vs. LED	NS	0.05	NS
S vs. LECS	0.05	0.05	NS
CH vs. LED	0.05	NS	NS
CH vs. LECS	NS	NS	NS
LED vs. LECS	0.05	0.05	0.05

S: Donadores Sanos; **CH:** Cicatriz Hipertrófica; **LED:** Lupus Eritematoso Discoide; **LECS:** Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo

Anexo 1

INDICE DE SEVERIDAD Y AREA DE LUPUS CUTANEO (CLASI):

ACTIVIDAD				DAÑO		
LOCALIZACION	ERITEMA	ESCAMA/ HIPERTROFIA	VASCULITIS	DESPIGMENTACIÓN	COSTRA/ ATROFIA/ PANICULITIS	LOCALIZACION
	0:ausente 1:rosa/ligero 2:Rojo 3:Rojo intenso;purpura Violáceo/ hemorrágico	0: ausente 1: escama 2:verrucosa/ hipetrofica	0: ausente 1: presente	0: Ausente 1: Presente	0: Ausente 1: costra o ciatriz 2: atrofia severa o paniculitis	
Piel cabelluda						Piel cabelluda
Orejas						Orejas
Nariz (región malar)						Nariz (región malar)
Resto de cara						Resto de cara
"V" cuello						"V" cuello
Cuello posterior						Cuello posterior
Tórax						Tórax
Abdomen						Abdomen
Espalda/gluteos						Espalda/gluteos
Brazos						Brazos
Manos						Manos
Piernas						Piernas
Pies						Pies

MUCOSAS

DESPIGMENTACIÓN

LESIONES DE MEMBRANAS MUCOSA		Despigmentación después que las lesiones resolvieron
0: NO 1: SI		<input type="checkbox"/> Despigmentación dura menos de 12 meses <input type="checkbox"/> Despigmentación dura más de 12 meses

ALOPECIA

RESIENTE PERDIDA DE CABELLO (dentro de los últimos 30 días)		
0: NO 1: SI		
ALOPECIA CLINICAMNETE NO CICATRIZAL		ALOPECIA CICATRIZAL
0: Ausente 1: Difusa; no inflamatoria 2: Focal o en placa (o parche) en un cuadrante 3: Focal o En parche en más de un cuadrante		0: Ausente 3: En un cuadrante 4: En dos cuadrantes 5: En tres cuadrantes 6: todo cráneo

INDICE DE ACTIVIDAD TOTAL

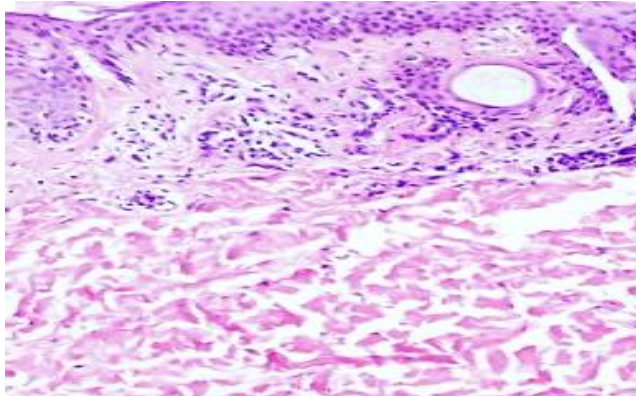
INDICE DE SEVRIDAD TOTAL

OTROS EN ESCALA ANALOGA DE 0 AL 10

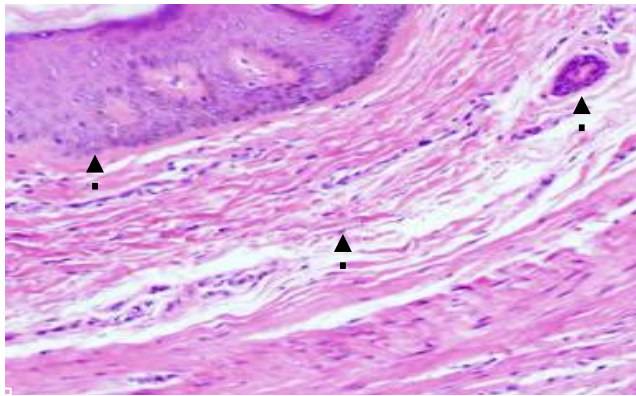
PRURITO	
0 (nada) A 10 (el máximo)	
DOLOR	
0 (nada) A 10 (el máximo)	

Anexo 2. Micrografías de Inmunohistoquímica

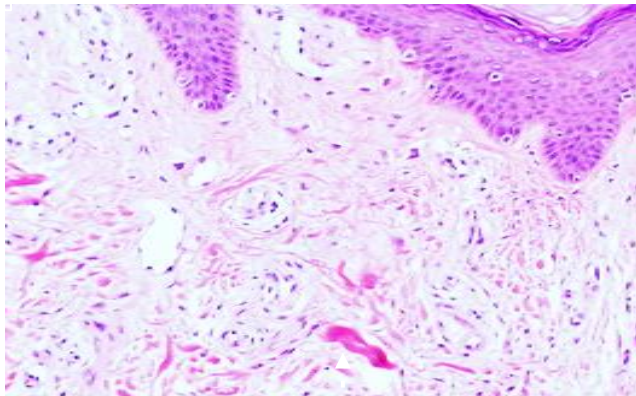
H&E



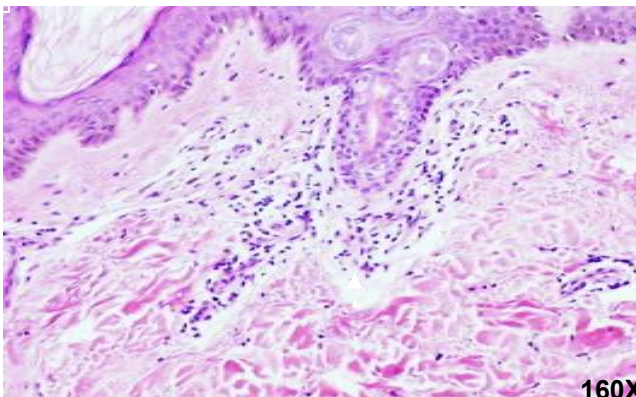
S



CH

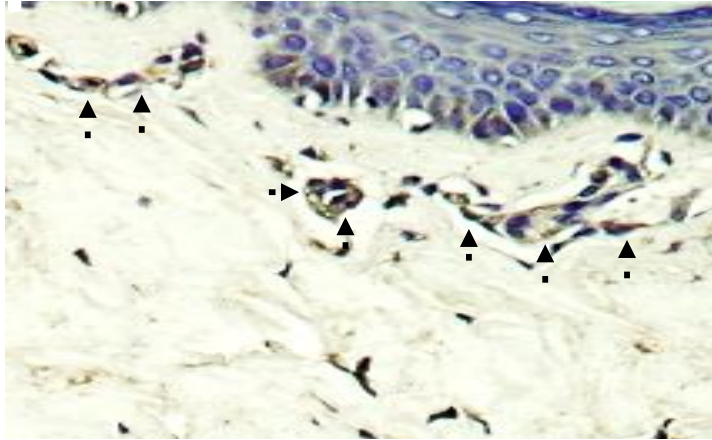


LED

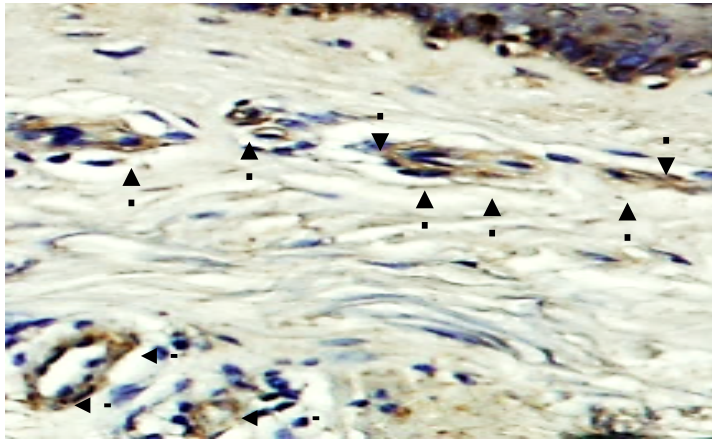


LECS

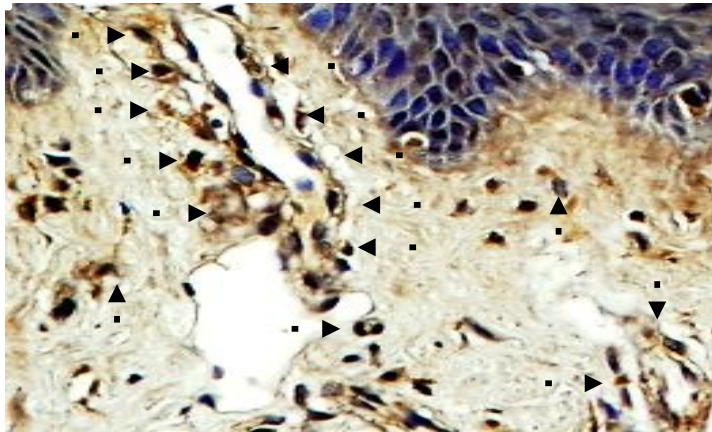
IL-22



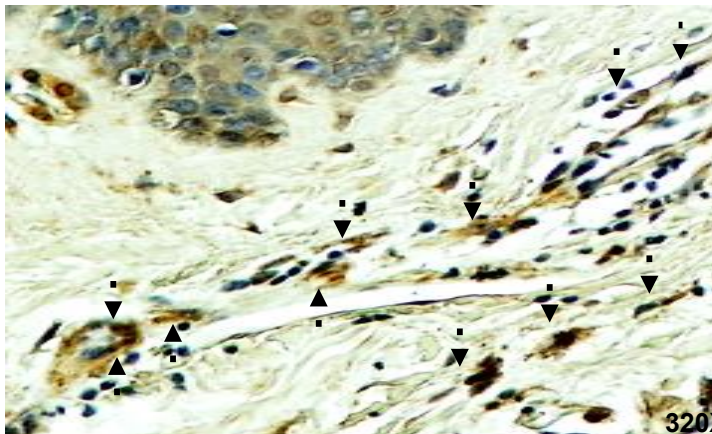
S



CH

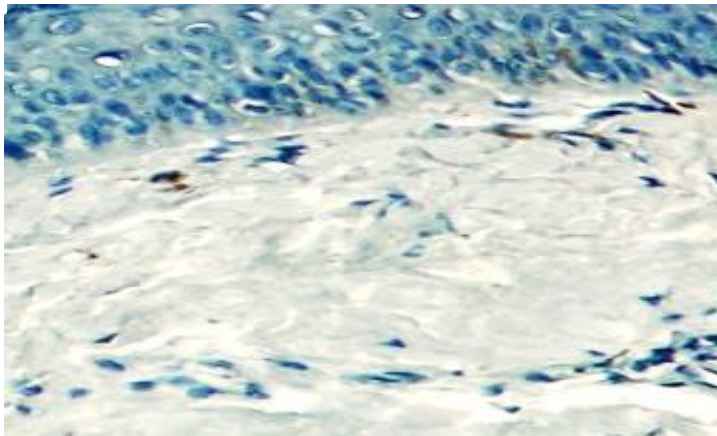


LED

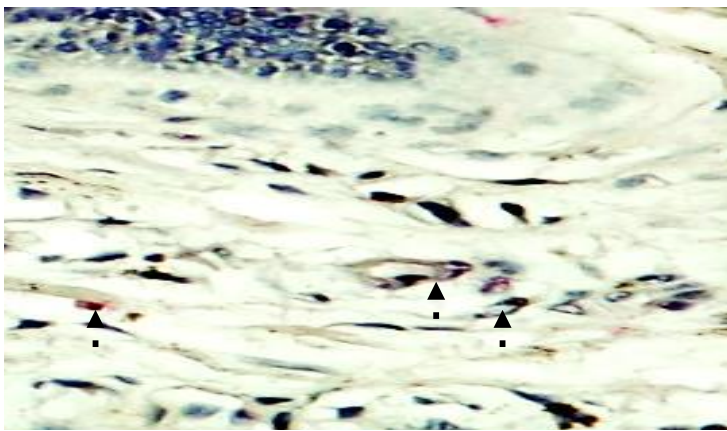


LECS

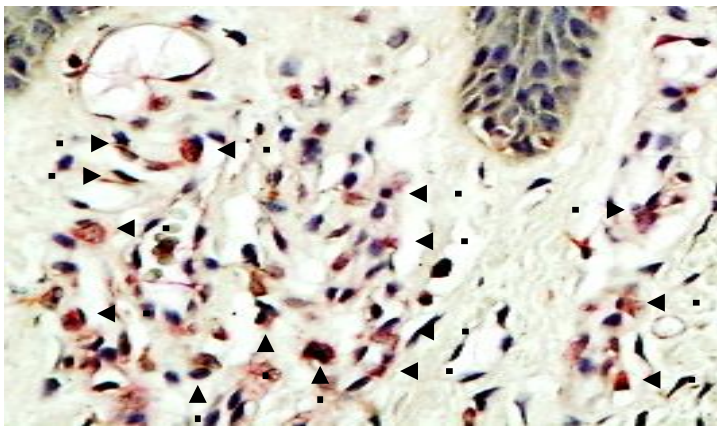
CD4/IL-17



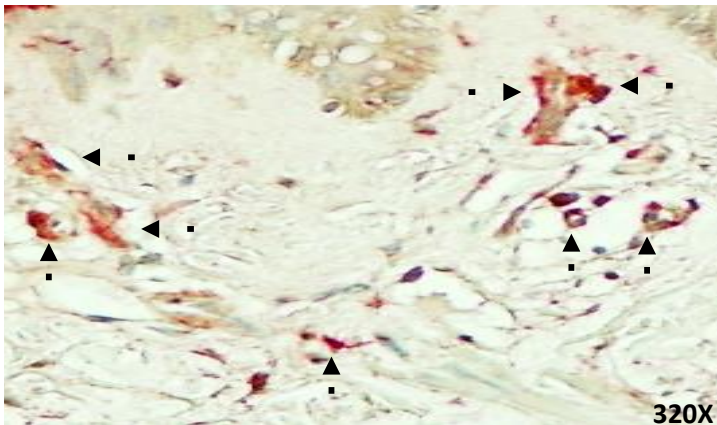
S



CH

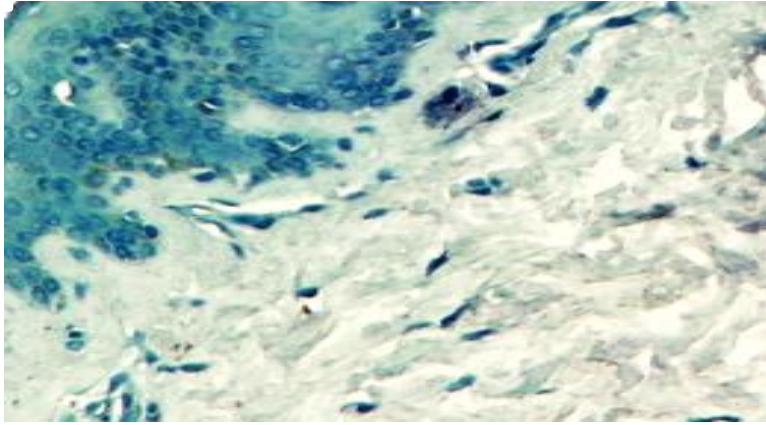


LED

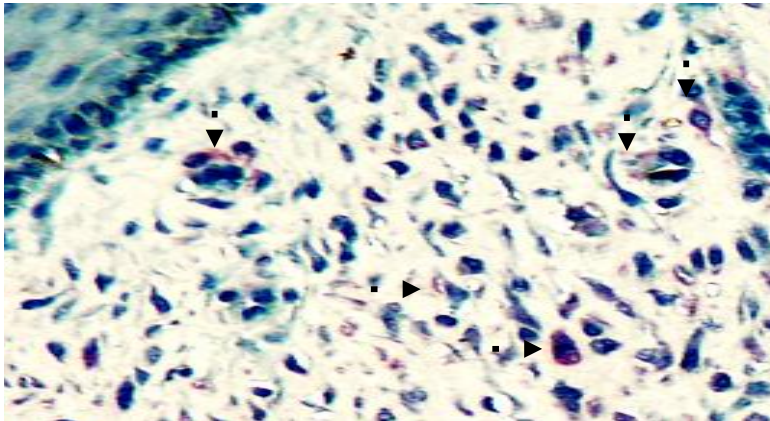


LECS

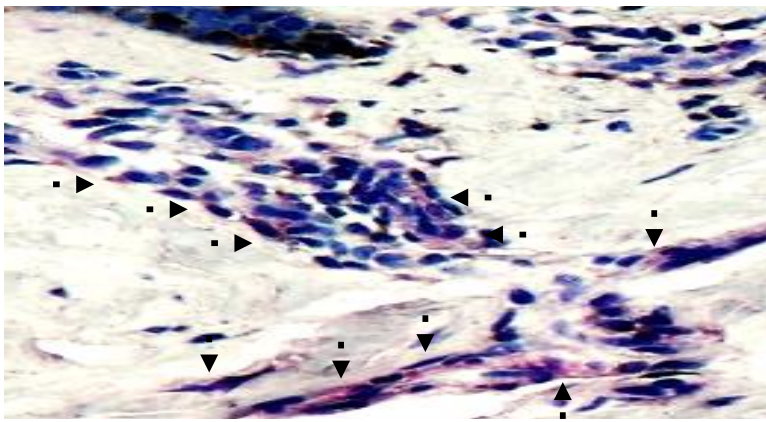
CD4/IL-4



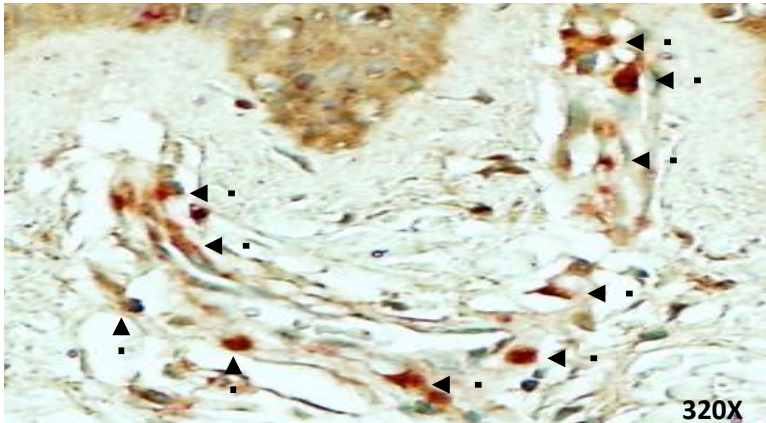
S



CH

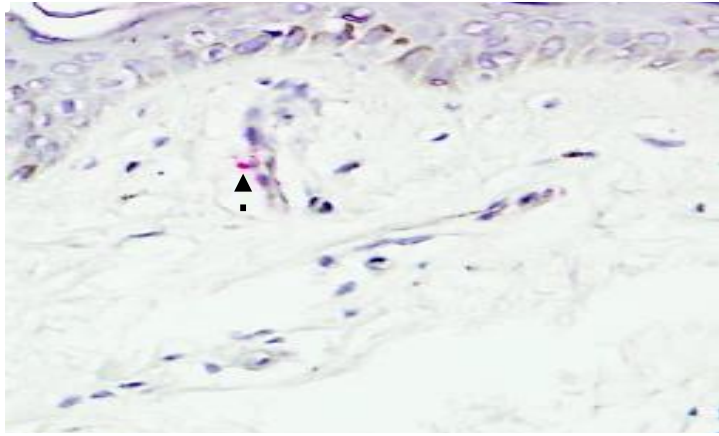


LED

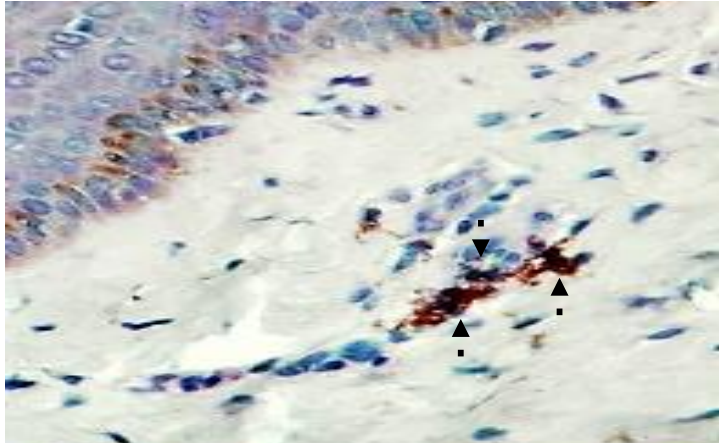


LECS

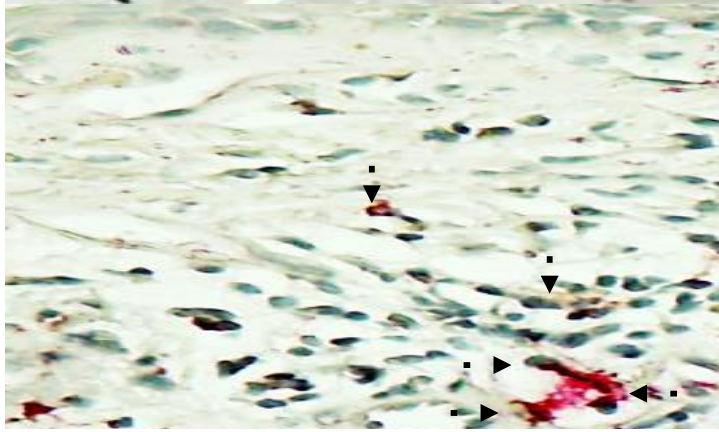
CD4/INF-



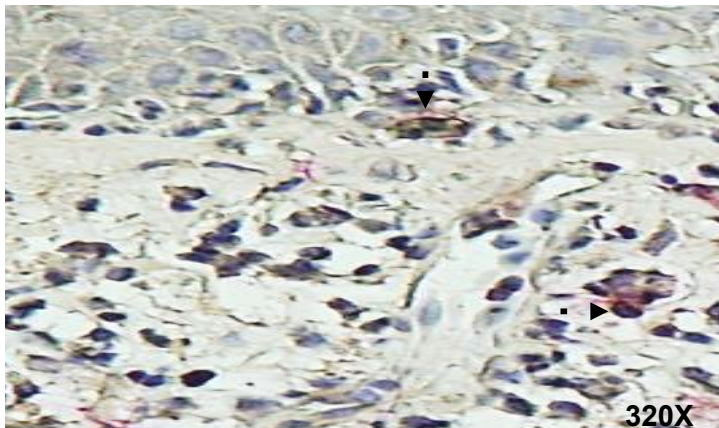
S



CH



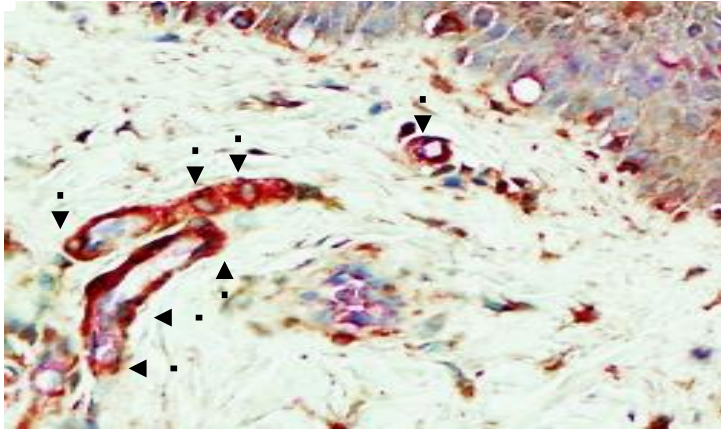
LED



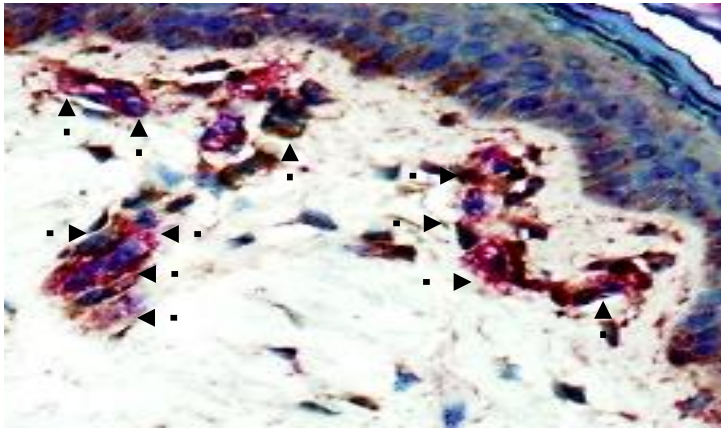
LECS

320X

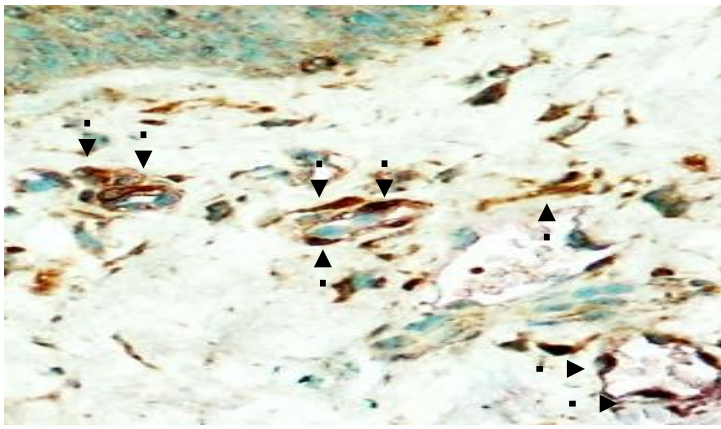
CD25/Foxp3



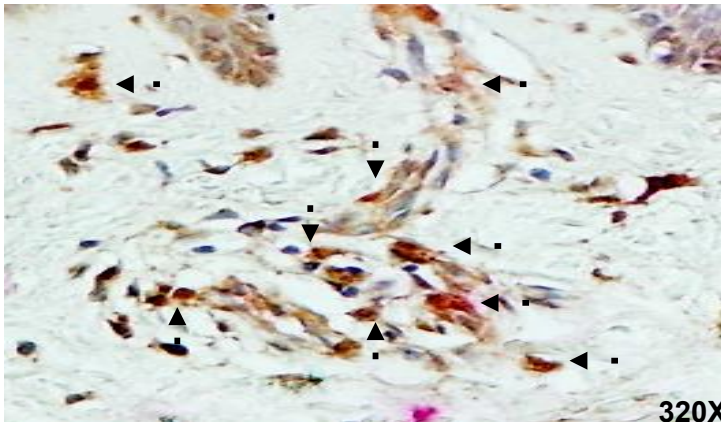
S



CH

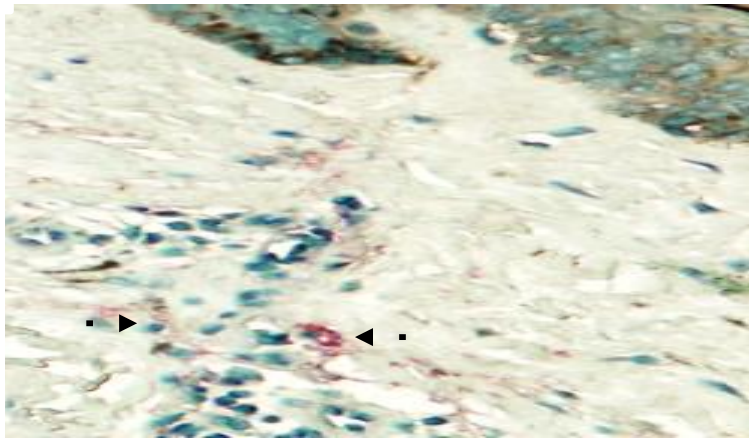


LED

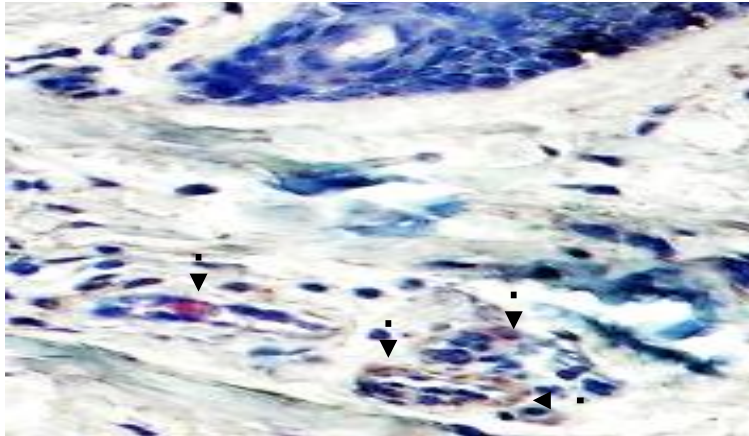


LECS

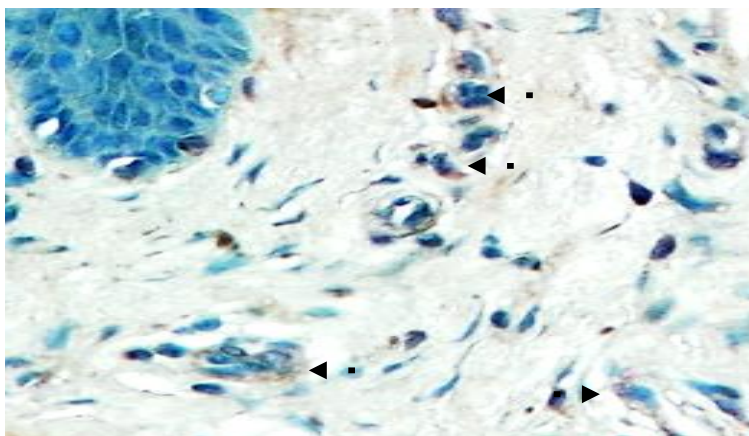
CD20/IL-10



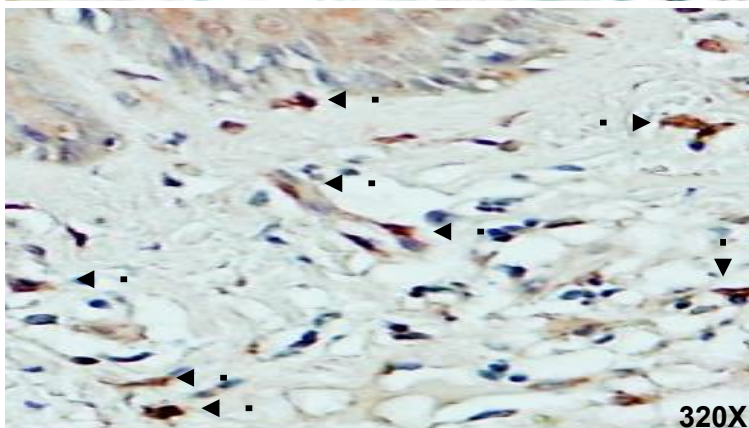
S



CH

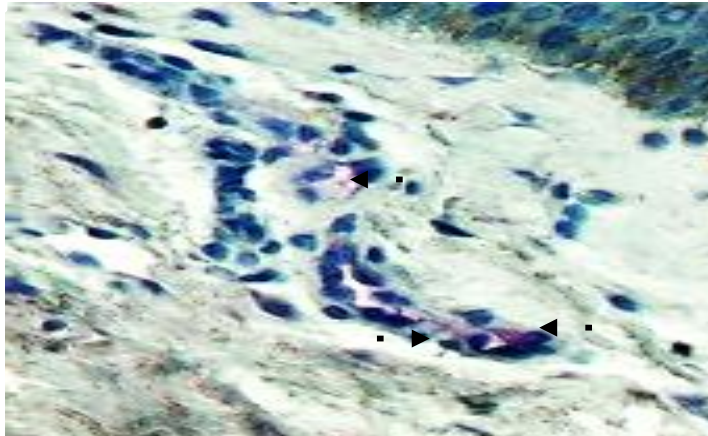


LED

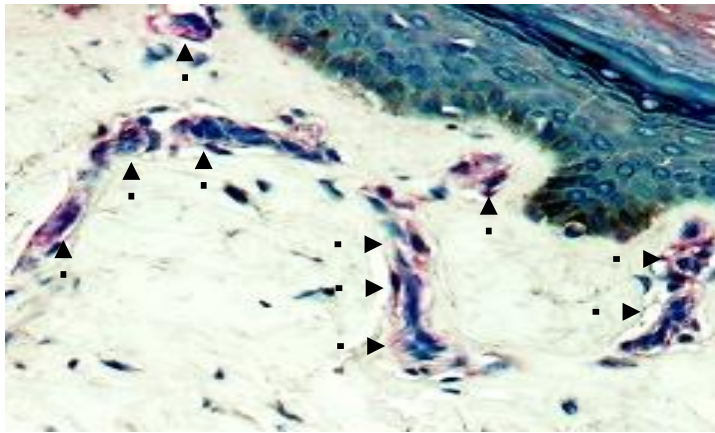


LECS

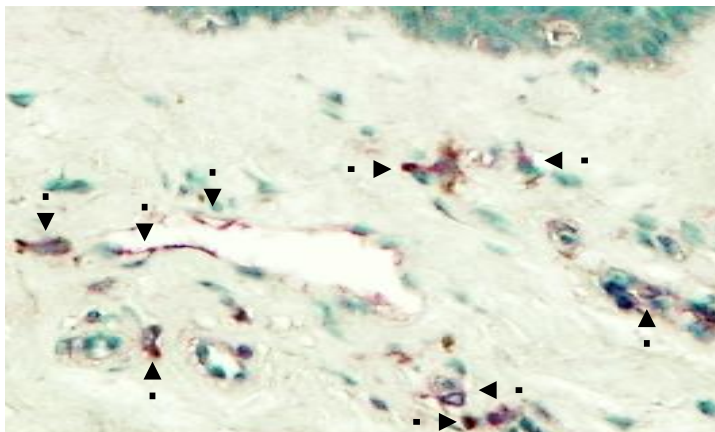
CD123/IDO



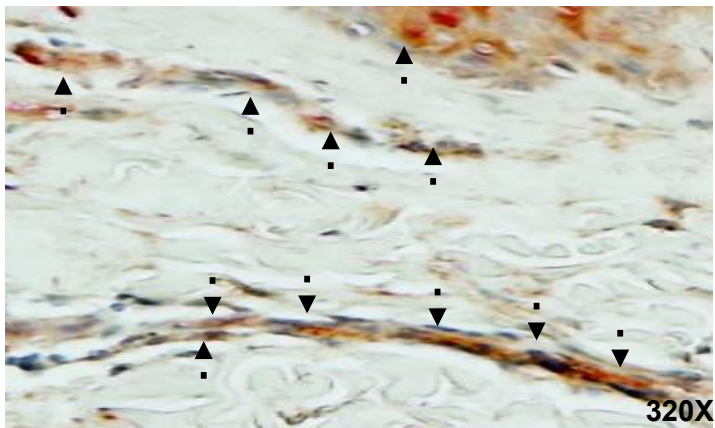
S



CH



LED



LECS

Anexo 3. Fotografías Clínicas

Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo



Lupus Eritematoso Cutáneo Discoide

