



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,**  
**ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**Título:**

**Papel de la respuesta inmune innata en la patogenia y desarrollo de atrofia en  
pacientes con miopatías inflamatorias idiopáticas**

**ALUMNO:**

José Jiram Torres Ruiz

**Tesis que para optar por el grado de doctor en ciencias médicas**

**Tutor principal:**

Dra. Diana Gómez Martín

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Sinodales de examen:**

**Dr. Gilberto Vargas Alarcón.** Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

**Dr. José Luis Maravillas Montero.** Coordinación de Investigación Científica, UNAM

**Dra. Josefina María Alberú Gómez.** Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

**Dr. Luis Javier Jara Quezada.** Instituto Mexicano del Seguro Social

Ciudad de México

Noviembre 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Índice de contenido.

<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>6</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>7</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>7</b>
<b>Objetivo primario.....</b>	<b>7</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>7</b>
<b>Métodos.....</b>	<b>8</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>15</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>45</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>45</b>

# **Papel de la respuesta inmune innata en la patogenia y desarrollo de atrofia en pacientes con miopatías inflamatorias idiopáticas**

## ***I. Introducción.***

Las miopatías inflamatorias idiopáticas (MII) son un grupo heterogéneo de enfermedades autoinmunes sistémicas con diversos fenotipos que incluyen a la dermatomiositis (DM), polimiositis (PM), miopatía necrosante inmunomediada (MN) y síndrome anti sintetasa (SA) [1]. La causa y fisiopatogenia de las MII no son completamente conocidas, pero se sabe que involucran elementos de la respuesta inmune adaptativa, innata, mediadores inflamatorios solubles y mecanismos no inmunes [2].

### **I.1 Inmunidad innata en la fisiopatogenia de las Miopatías inflamatorias idiopáticas**

A pesar del avance en el estudio de la fisiopatogenia de las MII, el papel de la inmunidad innata no ha sido completamente determinado. En pacientes con miopatías inflamatorias, aproximadamente 34% de las fibras expresan TLR4 [3] que es un receptor de HMGB1, la cual es una proteína pro-inflamatoria y quimiotáctica que se ha encontrado en el citoplasma de mioblastos, células inflamatorias y endoteliales [4]. A este respecto la proteína HMGB1 es fundamental en el impedimento de la contracción muscular ya que actúa señalizando a través de TLR4 para aumentar la fatiga muscular, mediante la reducción de la liberación de calcio proveniente del retículo sarcoplásmico [3, 5].

Como parte de la inmunidad innata, los monocitos y los neutrófilos parecen ser fundamentales en la inflamación muscular. Los monocitos son efectores importantes de la respuesta autoinmune patogénica [6, 7], ya que infiltran el músculo y son precursores de los macrófagos, que forman parte del infiltrado inflamatorio endomisial y perimisial en las biopsias de todos los subtipos de miopatías inflamatorias [8]. Los monocitos son capaces de fagocitar, presentar antígenos, secretar citocinas [9-11] y de expresar múltiples receptores tipo Toll (TLR) incluyendo 2 y 4 [12, 13]. Recientemente, se han descrito 3 diferentes subtipos de monocitos de acuerdo con su expresión del receptor de LPS (CD14) y de Fc $\gamma$ RIII (CD16): clásicos (CD14 $^{++}$ /CD16 $^{-}$ ), intermedios (CD14 $^{++}$ /CD16 $^{+}$ ) y no-clásicos (CD14 $^{+}$ /CD16 $^{++}$ ) [9, 14]. Dichas poblaciones de monocitos han demostrado ser genética y funcionalmente distintas [15], y en múltiples enfermedades autoinmunes se ha observado una expansión de monocitos intermedios, por lo que se consideran pro-inflamatorios [14-17].

Con respecto a los neutrófilos, se sabe que juegan un papel fundamental en el daño a membranas de miocitos, en donde aparentemente los diferentes ciclos de isquemia reperfusión promueven la liberación de radicales libres de oxígeno con el consecuente daño de membrana [18]. En modelos animales, hay lisis de la membrana celular con necrosis mediada por neutrófilos a las 2 horas del reinicio del movimiento después de períodos de tiempo prolongados de inmovilidad, mientras que se observa infiltración por macrófagos 12-24 horas después [18]. Cuando los miocitos se exponen a neutrófilos peritoneales de ratón, hay destrucción de miocitos inclusive en ausencia de mieloperoxidasa (MPO), lo cual implica que algunos de los mecanismos de destrucción de miocitos pueden ser independiente de esta enzima [18]; sin embargo, una vez que se recupera la movilidad de un músculo previamente inmóvil, aumenta la actividad de MPO [18]. La adición de superóxido dismutasa (SOD) aumenta aún más la lisis de miocitos mediada por MPO probablemente en relación al aumento del peróxido de hidrógeno inducido por SOD que a su vez se transforma en ácido hipocloroso [18].

Los neutrófilos son las células más abundantes en sangre periférica y el índice de neutrófilo/linfocito correlaciona con la velocidad de sedimentación globular (VSG), la proteína C reactiva (PCR) y la presencia de enfermedad pulmonar intersticial en DM [3]. Dos tipos de neutrófilos han sido reconocidos de acuerdo con su sedimentación después de la separación de sangre por gradientes de densidad, los neutrófilos convencionales y los granulocitos de baja densidad (GBD); estos últimos pueden ser distinguidos de los monocitos por su elevada expresión de CD15 y nula expresión de CD14 en las preparaciones de células mononucleares (CMNs) [4]. Además, los GBD CD10<sup>+</sup> se consideran neutrófilos maduros y se han encontrado aumentados en múltiples enfermedades autoinmunes como lupus y vasculitis ANCA [19], mientras que las CD10<sup>-</sup> se consideran precursores inmaduros presentes en infecciones graves [20]. Los GBD de pacientes con lupus favorecen un fenotipo Th1 [21] y son células productoras de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés), que son estructuras fibrilares compuestas por cromatina decorada con componentes de los gránulos de neutrófilos y que han sido reconocidas como un factor patogénico en múltiples enfermedades autoinmunes [22]. Además, las NETs han demostrado ser una fuente de moléculas pro-inflamatorias como HMGB1 y LL-37 [23].

***1.2. Respuesta inmune innata y su relación con el desarrollo de atrofia muscular.*** Se define como atrofia muscular a la disminución en el tamaño de los miocitos [24]. El músculo esquelético es un tejido dinámico que recibe señales anabólicas que incrementan la síntesis de proteínas a través de la vía del factor de crecimiento similar a insulina (IGF1/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR)) [24], mientras que los estímulos catabólicos incluyen denervación, inactividad, microgravedad, ayuno por cáncer, SIDA, diabetes, falla renal y cardíaca [24] e inflamación sistémica [25]. Los pacientes con MII presentan inmovilidad, inflamación muscular y sistémica como potenciales causas de atrofia. Además, en estudios histopatológicos de pacientes con DM sin tratamiento inmunosupresor, se han encontrado sensores de ácidos nucleicos dentro de las células musculares incluyendo TLR3 y RIG-I en fibras perifasciculares, perimisiales y atroficas [26], así como TLR9, RIG-I y BDCA-2 en el infiltrado inflamatorio de las biopsias de pacientes con DM/PM [26] y expresión de TLR9 en el sarcolema [27]. Dichos hallazgos conectan a las proteínas reguladas con interferón con la atrofia muscular en MII.

El músculo esquelético posee 4 formas de destrucción proteica incluyendo el lisosoma, calpains, sistema ubiquitina-proteasoma y caspasas, siendo la ubiquitinación el principal sistema mediador de atrofia muscular [28]. El sistema de ubiquitinación involucra una modificación postraduccional (MPT) mediante la cual se conjugan una o varias moléculas de ubiquitina a un sustrato proteico mediante tres reacciones enzimáticas secuenciales, que involucran a las enzimas E1 (activadora), E2 (conjugadora) y E3 (ligasa), la cual se encarga de catalizar la transferencia de la ubiquitina activada a un residuo de lisina del sustrato proteico [29].

Evidencia reciente proveniente, tanto de modelos animales, como de humanos apoyan el papel de las ligasas TRIM como reguladoras de la inmunidad innata y adaptativa [30]. Particularmente, se ha reportado la activación de la vía de ubiquitina-proteosoma en un modelo murino de miositis inmune (dependiente de la sobre-expresión de MHC-I) mediante SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) y espectrometría de masas [31]. En este trabajo se encontró un incremento significativo en la ubiquitinación de diversas proteínas musculares, lo cual fue específico de la presencia de miositis, no se encontró en otras miopatías como las disferlinopatías y se asoció cronológicamente con el inicio de los síntomas musculares [31]. También se ha demostrado que existe incremento en los transcritos de enzimas modificadoras de ubiquitina (Ube1L, Ube2L6) en el músculo de pacientes con DM [32].

En el músculo esquelético, dos especies fundamentales de E3 ligasas de ubiquitina llamadas atrogin-1/MAFbx (muscle atrophy F-box protein) y MuRF-1 (muscle RING finger-1 protein) o TRIM63 se encuentran sobre expresadas en estados catabólicos e interactúan con el complejo calcineurina A- $\alpha$ -actinina 2 y con titina respectivamente [28] y al mismo tiempo, la deficiencia de estas ligasas reduce 56% la atrofia [33]. Mediante ensayos de ubiquitinación *in vitro*, se ha reportado que los sustratos de TRIM63 incluyen a la cadena pesada de miosina, péptido C de unión a miosina y cadenas ligeras de miosina 1 y 2 [34]. Específicamente, la ubiquitinación de la cadena pesada de miosina se asocia a su degradación por la vía del proteosoma y a la presencia de atrofia inducida por dexametasona en un modelo murino [34].

***1.3. Importancia clínica de la atrofia muscular en pacientes con MII.*** Las MII son una causa fundamental de morbilidad secundaria a atrofia muscular y de muerte prematura por infecciones, cáncer, enfermedad cardiovascular y enfermedad pulmonar intersticial (EPI) [35]. Desde el punto de vista clínico, cabe resaltar que la atrofia muscular se considera un signo de daño acumulado dentro de los 11 aparatos y sistemas que toma en cuenta el índice de daño de miositis (myositis damage index (MDI), por sus siglas en inglés) [36] y que la discapacidad relacionada con la disfunción muscular reduce la calidad de vida de los pacientes con MII. Casi el 100% de los adultos con MII desarrollan daño acumulado 18 meses después del diagnóstico de la enfermedad y algunos estudios han demostrado que se desarrolla atrofia hasta en el 83.3% de los casos con una alta prevalencia de discapacidad secundaria a atrofia o disfunción muscular en el 74-84% de los pacientes [37].

En resumen, se tiene evidencia de que los componentes del sistema inmune innato (neutrófilos, macrófagos) contribuyen al daño muscular. Además la atrofia muscular en MII es multifactorial y posiblemente se encuentra mediada por la conjunción de inmovilidad, inflamación sistémica incluyendo la secreción de IFN tipo I y II y la activación de la vía de ubiquitina-proteasoma. Sin embargo, la mayoría de esta evidencia proviene únicamente de modelos animales, o pacientes con patologías que se asocian al desarrollo de síndromes caquécticos, como diabetes, sepsis y cáncer.

## **II. Planteamiento del problema.**

El conocimiento del papel de los componentes de la inmunidad innata como biomarcadores de actividad, respuesta clínica completa y contribuyentes a la inflamación y atrofia en las MII es escaso. Además, se desconoce si existen alteraciones en la expresión de las ligasas de ubiquitina Atrogin-1 y MuRF1 en pacientes

con MII y su relación con las proteínas reguladas por interferones, que constituyen citocinas clave en la patogenia de dichas enfermedades.

### **III. Justificación**

La atrofia muscular es una secuela irreversible e incapacitante en pacientes con MII, por lo que el análisis de las ligasas de ubiquitina que la promueven es fundamental. Además, analizar los componentes de la inmunidad innata como biomarcadores de actividad en pacientes con miopatías y su contribución al daño muscular irreversible contribuirá a completar el esquema fisiopatológico de la inflamación y atrofia muscular en pacientes con MII. De manera secundaria, es posible que la expresión de dichas ligasas de ubiquitina pueda ser un factor de pronóstico en sujetos con MII y el diseccionar la vía de acción de dichas enzimas permitirá proponer medidas preventivas para evitar la aparición de atrofia muscular.

### **IV. Hipótesis**

Los pacientes con MII presentarán alteraciones cuantitativas y cualitativas en los componentes de la inmunidad innata (neutrófilos y monocitos), así como un incremento en la expresión de las E3 ligasas de ubiquitina TRIM 63 y Atrogin-1 y de las proteínas relacionadas con interferones en músculo asociada a la presencia de atrofia.

### **V. Objetivo primario**

Analizar las alteraciones en la proporción y función de las subpoblaciones de monocitos y neutrófilos, así como la expresión de las E3 ligasas de ubiquitina TRIM63 y Atrogin-1 en músculo y CMNs y su asociación con proteínas inducidas por interferones en tejido muscular de pacientes con MII.

### **VI. Objetivos específicos**

1. Evaluar la proporción de las subpoblaciones de monocitos (clásicos, no clásicos, intermedios), su expresión de TLR2 y TLR4 y su relación con las características clínicas de pacientes con MII.
2. Evaluar la proporción de GBD y su asociación con características clínicas de pacientes con MII.
3. Evaluar la capacidad de los neutrófilos convencionales y de GBD para producir NETs y su contenido proteico, así como la presencia de NETs en tejidos de pacientes con MII.
4. Evaluar los niveles de citocinas circulantes en pacientes con MII.
5. Analizar la relación entre la expresión de las E3 ligasas de ubiquitina atrogin-1 y TRIM63 y las proteínas relacionadas con interferones.

6. Evaluar la expresión de Atrogin-1 y TRIM63 en diversas subpoblaciones de CMNs (linfocitos T CD4+, CD8+, monocitos clásicos) y su asociación con atrofia clínicamente determinada.

## **VII. Métodos.**

**VII.1. Integración de la cohorte de pacientes con miopatías inflamatorias idiopáticas.** Desde 2016, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) se integró una cohorte con reclutamiento escalonado compuesta por 142 pacientes con diagnóstico de MII de acuerdo a los criterios de ACR/EULAR, Bohan y Peter, Connor y Sontheimer [38-41]. A lo largo de su seguimiento, se han medido cada 3-4 meses las siguientes escalas de actividad y daño [38]:

1. Manual muscle testing (MMT8).
2. Actividad global por parte del médico y el paciente mediante escala visual análoga (EVA).
3. Myositis disease activity assessment tool (MDAAT).
4. Myositis intention to treat activity index (MITAX).
5. Health assessment questionnaire (HAQ).
6. Enzimas musculares.
7. Cutaneous dermatomyositis disease area and severity index (CDASI), como escala de actividad y daño cutáneo.

De igual forma, en cada visita se ha registrado el tipo y dosis de tratamiento inmunosupresor y la presencia de actividad de la enfermedad, respuesta clínica completa y remisión. Se definió como respuesta clínica completa a la ausencia de actividad muscular o extra-muscular en presencia de tratamiento inmunosupresor y remisión a la ausencia de actividad muscular y extra-muscular sin tratamiento inmunosupresor [42]. Al momento del diagnóstico, se llevó a cabo una capilaroscopia del lecho ungueal para evaluar la presencia de capilares dilatados, mega-capilares, hemorragias, trombosis, neo-vascularización o ausencia de capilares [43] con un capilaroscopio 500X. Del expediente clínico se registró la afectación pulmonar y cardiaca. Se definió como atrofia clínicamente determinada a la presencia de al menos 1 punto en el dominio muscular del MDI [38]. Se midieron los títulos y patrones de anticuerpos anti nucleares mediante inmunofluorescencia indirecta y los anticuerpos específicos y asociados a miopatías mediante el kit EUROLINE (Euroimmune AG, Luebeck, Alemania). Se excluyeron para este estudio los pacientes con padecimientos inflamatorios crónicos y que conllevan atrofia como DM2, EPOC, neoplasias malignas, sepsis, daño por denervación.

**VII.2. Inmunotipificación mediante citometría de flujo.** Una muestra de sangre venosa periférica de pacientes con MII y controles sanos ajustados para edad y género se separó mediante gradientes de densidad con Lymphoprep (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá). Se tomó el anillo CMNs y las células se lavaron dos veces con phosphate buffered saline (PBS). Se agregó el marcador de viabilidad Zombie aqua (Biolegend, San Diego, California, EUA) y posteriormente las células se lavaron 2 veces con suero fetal bovino al 5% en PBS.

Las células se marcaron con los siguientes anticuerpos acoplados a fluorocromos: CD3-APC-H7, CD4-AF488, CD8-PE-CF594, CD14-PerCP, CD10-PE, CD15-FITC, TLR2-BV421, TLR4-APC (Biolegend, San Diego CA, EUA). En 45 pacientes, se evaluó la proporción de monocitos clásicos (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>), intermedios (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>) y no clásicos (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>++</sup>) de acuerdo con la International Union of Immunological Societies [44]. De igual forma, se calculó la proporción de cada subpoblación de monocitos que expresaban TLR2 y TLR4 y la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada uno.

En 65 pacientes, se determinó la proporción de GBD. Los GBD totales fueron aquellos CD15<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup> en el gate de CMNs, mientras que los maduros fueron positivos para CD10 y los inmaduros CD10<sup>-</sup>. En el retrogating, se corroboró que la población cuantificada corresponde a neutrófilos

En 35 pacientes sin tratamiento con esteroides o con menos de dos semanas de consumirlos, se evaluó la proporción y expresión con intensidad media de fluorescencia (IMF) de las E3 ligasas de ubiquitina TRIM63 y Atrogin-1 en células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>) mediante inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. Después del marcaje de superficie, las CMNs se permeabilizaron, fijaron y se marcaron con anti TRIM63 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) y anti Atrogin-1 (Abcam, Cambridge, RU) 1: 100 durante 30 min a 4°C en perm wash solution (BD, Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). Después de 2 lavados, las células se incubaron con el anticuerpo secundario AF647 1:1000 (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, EUA) durante 30 min a 4°C. Las muestras se adquirieron en un citómetro LSR fortessa de 4 láseres y fueron analizadas con el software Flow-Jo v10. Las estrategias de gating se muestran en las figuras 1-3.

Figura 1. Estrategia de gating para la determinación de subpoblaciones de monocitos y su expresión de TLR2 y TLR4.

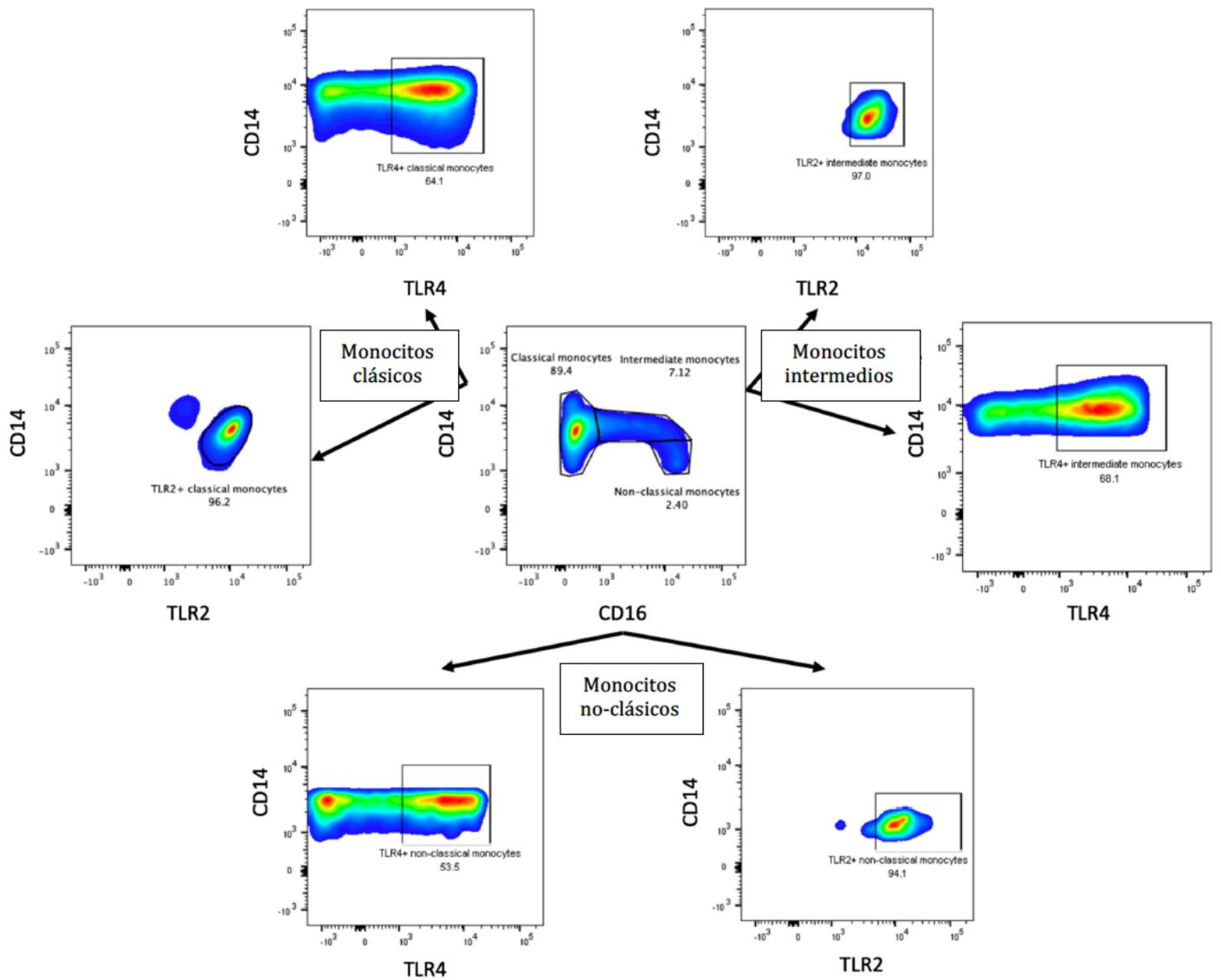
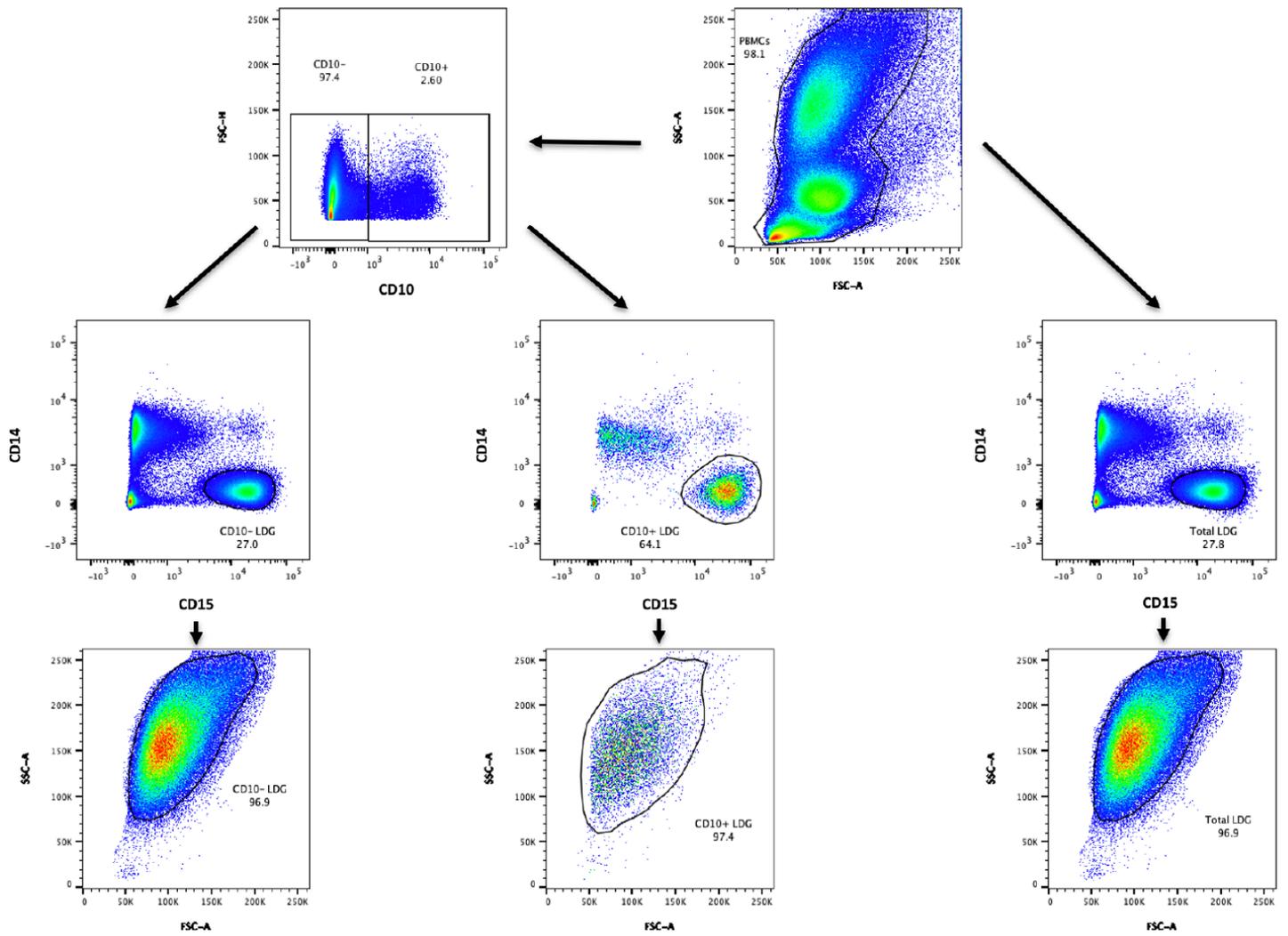
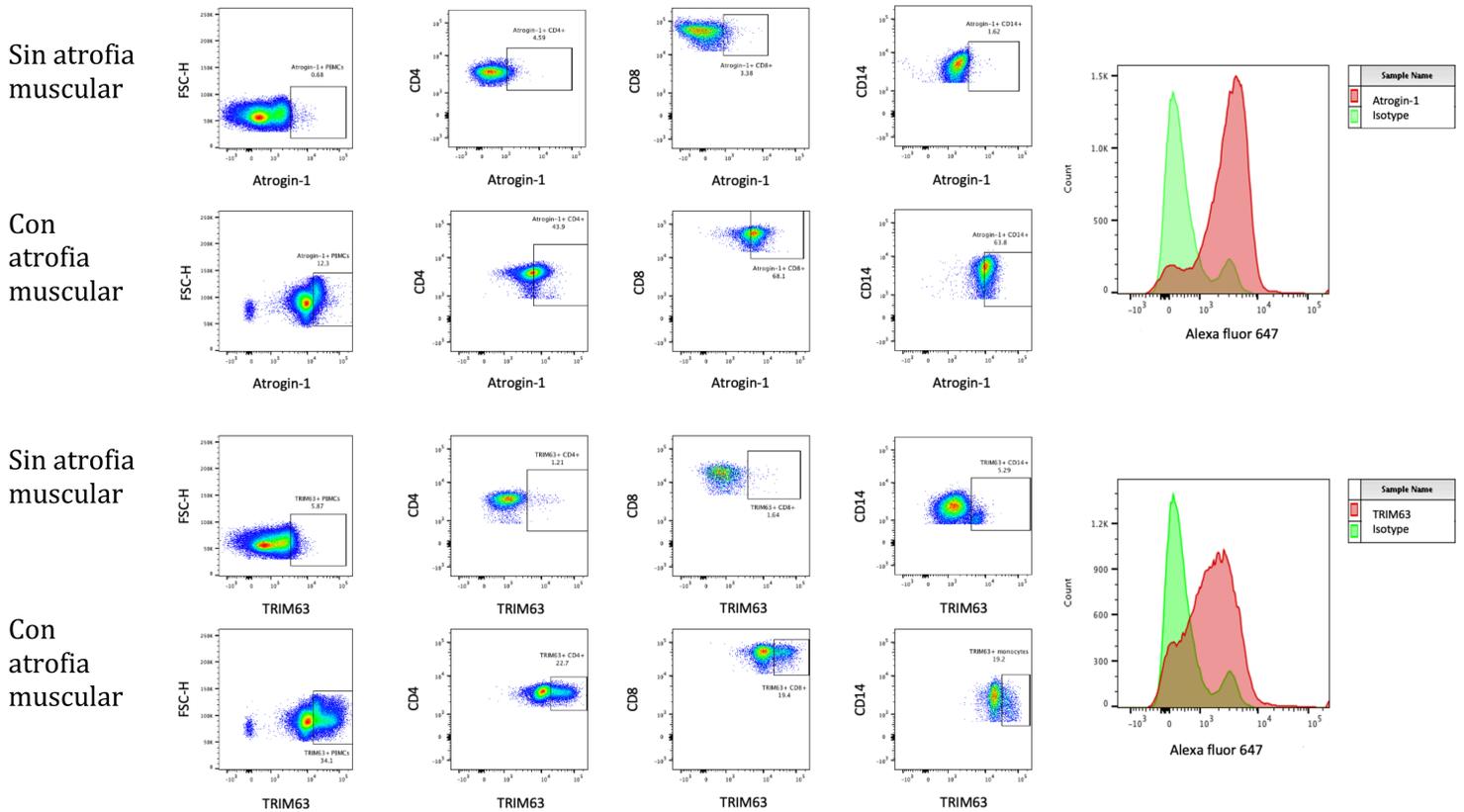


Figura 2. Estrategia de gating para la determinación de granulocitos de baja densidad.



**Figura 3. Estrategia gating para la determinación de la expresión de E3 ligasas de ubiquitina TRIM63 y Atrogin-1 en CMN.**



**VII.3. Determinación de citocinas en suero.** Los niveles de IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 fueron medidos mediante el Th1/Th2/Th17 cytometric bead array (CBA) kit (BD, Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) y analizados con el software FCAP array v3.0 (BD, Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). Los niveles de IL-18 séricos fueron medidos mediante ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN, EUA) acorde a las instrucciones del proveedor.

**VII.4. Evaluación de NETs circulantes.** Para determinar la cantidad de NETs circulantes, se llevó a cabo ELISA sandwich para detectar los complejos DNA -elastasa de neutrófilo (EN) y MPO como se ha descrito previamente [45]. Brevemente, placas de 96 pozos se recubrieron toda la noche a 4°C con anti elastasa de

neutrófilo (Abcam, Cambridge, United Kingdom) o anti MPO (Dako, Santa Clara, California, USA) en coating buffer proveniente del kit Cell Death Detection ELISA (Roche, Mannheim, Germany). Después de bloquear con albúmina sérica bovina (ASB) al 1%, las placas se incubaron con 200  $\mu$ L de suero diluido 1:10 en ASB. Después de lavar, las placas se incubaron con anti-DNA-POD por 1 hr. Las placas se lavaron y se agregó el sustrato 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma, Darmstadt, Alemania). Finalmente, se midió la absorbancia en un lector de ELISA a 450 nm después de agregar la solución de paro (stop solution).

**VII.5. Inducción de NETs.** Las NETs de GBD se obtuvieron después de su aislamiento por selección positiva mediante perlas magnéticas con un anticuerpo anti CD10 (Miltenyi Biotec, Alemania). Las NETs de neutrófilos convencionales se obtuvieron después de su aislamiento mediante sedimentación con dextrán. Los neutrófilos se incubaron en placas de 12 pozos por 4 hrs a 37°C para obtener NETs espontáneas de GBD y neutrófilos convencionales y también se indujeron NETs con LPS, 1  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) en neutrófilos convencionales. Finalmente, las NETs se extrajeron de las placas de cultivo mediante tratamiento con nucleasa de micrococo (Thermo Scientific; Waltham, MA, United States) como previamente fue descrito [28].

**VII.6. Cuantificación de NETs y su contenido de LL-37.** Los GBD o neutrófilos convencionales se incubaron por 1.5 hrs en cubreobjetos recubiertos con poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich, Alemania) en presencia o ausencia de LPS para obtener NETs espontáneas o inducidas por LPS respectivamente. Los GBD no se estimularon con LPS por su capacidad de producir NETs espontáneamente. Después de fijar las células con paraformaldehído al 4% (Santa Cruz Biotechnology, EUA), se lavaron con PBS, se bloquearon con gelatina porcina al 0.02% (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) y se incubaron a 37°C durante 2 hrs con los siguientes anticuerpos primarios: rabbit anti elastasa de neutrófilo (Abcam, Cambridge, RU) y anti LL-37 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA) [46], ambos 1: 500. Posteriormente, se usaron los siguientes anticuerpos secundarios: Donkey anti rabbit AF555 1: 500 y donkey anti mouse AF488 1: 250 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA). Todos los anticuerpos fueron diluidos en gelatina porcina. Se usó Hoechst (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) 1:1000 en PBS para teñir la cromatina.

**VII.7. Inmunofluorescencia para detección de NETs, ligasas de ubiquitina y proteínas asociadas a interferón tipo I y II en biopsias de pacientes con MII.** Los cortes incluidos en parafina se desparafinaron

con dos lavados secuenciales en xileno y alcohol absoluto durante 10 minutos, y un lavado durante 5 minutos con alcohol al 95%, 70% y 50%. Posteriormente, se llevó a cabo la recuperación de epítopes con la solución IHC-TEK (IHC WORLD Life Science Products & Services, Ellicott City, MD, EUA) durante 40 min. Después de bloquear durante 30 minutos con ASB al 10%, se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anti histona 4 citrulinada humana (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) 1: 250, anti-laminina gamma (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA.) 1: 250, antiTRIM63 (R&D systems, Minneapolis, MN, EUA) y anti atrogin-1 (Abcam, Cambridge, RU) 1:100, anti MHC-I (Abcam, Cambridge, RU) 1:100, anti HLA-DR (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA), anti ISG-15 (Abcam, Cambridge, RU) 1:100, anti ubiquitina (P4D1) (Santa Cruz, Dallas, Texas, EUA) 1:100 y se incubaron durante la noche a 4°C. Después de lavar tres veces con PBS, se aplicaron los siguientes anticuerpos secundarios: donkey anti rabbit Alexa fluor 555 1:250, donkey anti mouse Alexa fluor 488 1:100 y donkey anti goat Alexa fluor 647 1:250 (todos de ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en BSA al 5%. Después de lavar, los portaobjetos se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con Hoechst 33342 1: 1000 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA). Para las biopsias congeladas, seguimos los mismos pasos comenzando por el bloqueo. Usamos el mismo protocolo de tinción omitiendo los anticuerpos primarios como control de isotipo. Las muestras se montaron con la solución de montaje, ProLong® Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA) y fueron adquiridas con un microscopio confocal Eclipse Ti-E Nikon (Minato, Tokyo, Japón).

Mediante microscopía confocal, se cuantificó la cantidad de estructuras fibrilares en donde co-localizara la elastasa de neutrófilo o MPO con DNA (NETs) con respecto a las células en 6 campos de 40X. También se cuantificó la expresión de LL-37 en NETs mediante la intensidad media de fluorescencia [46]. Las imágenes fueron analizadas mediante el software Fiji.

**VII.8. Expresión de LL37 en NETs de pacientes con MII mediante western blot .** La expresión de LL-37 en NETs fue corroborada mediante western blot. Brevemente, se cargaron 300 mcg de proteína en un gel de poliacrilamida (4-15%). Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de polivinilideno difluorido (PVDF), se bloquearon con starting block (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA) por 1 hr y se usaron los siguientes anticuerpos primarios y secundarios: mouse anti LL-37 (Santa Cruz

Biotechnology, Dallas, Texas, EUA) y rabbit anti MPO (Dako, Santa Clara, California, EUA), goat anti mouse y donkey anti-rabbit horse rabbit peroxidase (HRP) (Thermofisher, Waltham, MA, EUA). Las imágenes fueron generadas con quimioluminiscencia con el sustrato para western blot ECL (enhanced chemiluminescence) (Thermofisher, Waltham, MA, EUA) con una cámara CCD (charged-coupled device) (Chemidoc MP, Biorad; Hercules, CA, EUA) y cuantificadas con el software ImageLab (Biorad, Hercules, CA, EUA). La concentración de LL37 en NETs fue normalizada para la concentración de MPO.

## VIII. Resultados.

*VIII.1. Integración de la cohorte de pacientes con MII.* Las características clínicas, de laboratorio y gabinete de los pacientes de la cohorte se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Características clínicas y de tratamiento de los pacientes con MII al momento de su ingreso a la cohorte.**

<b>Variable (N=142)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>
Mujer N (%)	112 (78%)
Edad (años)	45 (37-56)
Tiempo de evolución (meses)	24 (6-48)
<b>Diagnóstico</b>	
Dermatomiositis del adulto	96 (67.6)
Dermatomiositis de inicio juvenil	13 (9.2)
Dermatomiositis clínicamente amiopática	5 (3.5)
Polimiositis	2 (1.4)
Miopatía necrosante inmunomediada	3 (2.1)
Síndrome anti sintetasa	15 (10.6)
Miopatía asociada a anti Ku o PM/Sc175	8 (5.6)
<b>Anticuerpos de miopatías</b>	
Anti Jo1 N (%)	14 (9.8)
Anti PL7 N (%)	7 (5)
Anti PL12 N (%)	7 (5)

Anti EJ N (%)	3 (2.1)
Anti OJ N (%)	0 (0)
Anti Mi2 N (%)	37 (26.2)
Anti SRP N (%)	8 (5.7)
Anti MDA5 N (%)	19 (13.5)
Anti NXP2 N (%)	18 (12.8)
Anti TIF-1gamma N (%)	10 (7.1)
Anti Ro52 N (%)	41 (29.1)
Anti PM/Scl100 N (%)	9 (6.4)
Anti PM/Scl75 N (%)	13 (9.2)
Anti Ku N (%)	13 (9.2)
Anti SAE N (%)	5 (3.5)
<b>Tratamiento inmunosupresor</b>	
Uso de prednisona N (%)	80 (56.3)
Dosis de prednisona (mg/d)	17.5 (6.2-47.5)
Uso de azatioprina N (%)	39 (27.7)
Dosis de azatioprina (mg/d)	75 (50-100)
Uso de metotrexate N (%)	56 (39%)
Dosis de metotrexate (mg/semana)	20 (15-25)
Uso de mofetil micofenolato N (%)	11 (7.8%)
Dosis de mofetil mocofenolato (g/d)	1.5 (0.5-2)
Uso de anti-maláricos N (%)	49 (34.8%)
Uso de metotrexate+azatioprina N (%)	20 (14%)
<b>Escalas de actividad y daño</b>	
Actividad global por el médico por escala visual análoga (EVA)	6.5 (1-8)
Actividad global por el paciente por (EVA)	7 (2-9)
MMT8	139 (118-150)

CDASI activo	4 (0-16.5)
CDASI crónico	1 (0-6)
Leucocitos totales (x 10 <sup>9</sup> x L)	6.2 (4.6)
Linfocitos totales (x 10 <sup>6</sup> x L)	1153 (750-1726)
Neutrófilos (x 10 <sup>6</sup> x L)	3900 (2800-5760)
Monocitos (x 10 <sup>6</sup> x L)	445 (360-576)
Índice neutrófilos/linfocitos	4.74 (2.42-11.12)
Hemoglobina (gr/dL)	14.2 (13.4-15.2)
Creatinina (mg/dL)	0.6 (0.44-0.71)
Nitrógeno ureico en sangre (BUN) (mg/dL)	12.65 (10.15-16.40)
Creatina-fosfato kinasa (CPK) (U/L)	203 (86-811)
Aldolasa (U/L)	11.7 (6.3-53.87)
Alanino-aminotransferasa (ALT) (U/L)	34 (18-68)
Aspartato-aminotransferasa (AST) (U/L)	36 (22-92)
Albúmina (gr/dL)	4.1 (3.7-4.4)
Globulinas (gr/dL)	3 (2.6-3.3)
C3 (mg/dL)	119 (133-144)
C4 (mg/dL)	26 (20-31)
Proteína C reactiva (PCR) (mg/dL)	0.3 (0.11-1.16)
Velocidad de sedimentación globular (VSG) (mm/hr)	9 (4-16)
MDAAT EVA constitucional	0 (0-4)
MDAAT suma constitucional	3 (0-8)
MDAAT EVA cutáneo	3 (0-8)
MDAAT suma cutáneo	4 (0-13)
MDAAT EVA gastrointestinal	0 (0-0)
MDAAT suma gastrointestinal	0 (0-0)
MDAAT EVA pulmonar	0 (0-3)

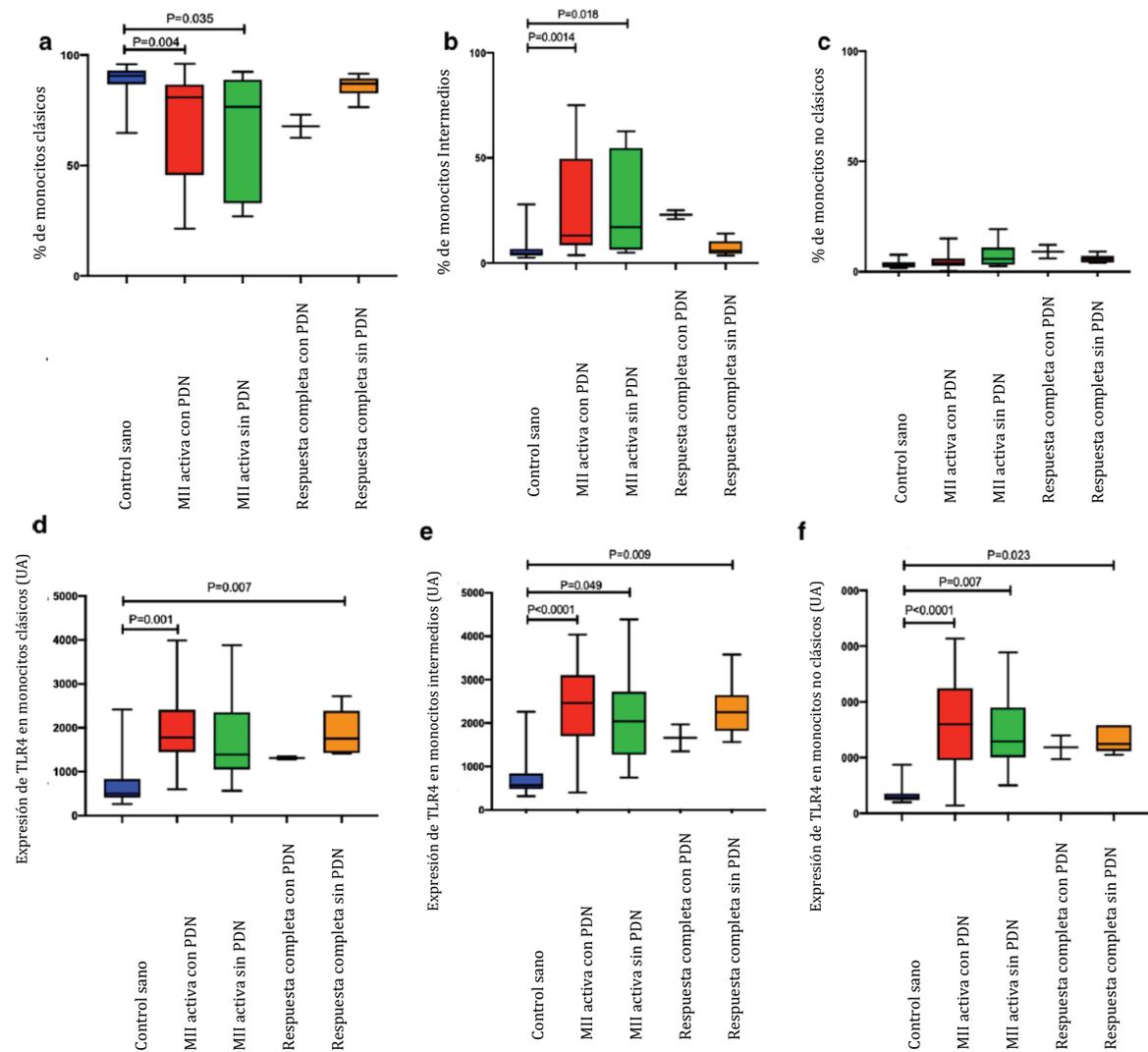
MDAAT suma pulmonar	0 (0-2)
MDAAT EVA cardiovascular	0 (0-0)
MDAAT suma cardiovascular	0 (0-0)
MDAAT EVA otra actividad	0 (0-0)
MDAAT suma otra actividad	0 (0-0)
MDAAT EVA extramuscular	3 (0-8)
MDAAT EVA muscular	2 (0-7)
MDAAT suma muscular	2 (0-4)
Daño EVA muscular	0 (0-4.75)
Daño suma muscular	0 (0-1)
Daño EVA cutáneo	0 (0-4)
Daño suma cutáneo	0 (0-2)
Daño EVA gastrointestinal	0 (0-0)
Daño suma gastrointestinal	0 (0-0)
Daño EVA pulmonar	0 (0-0)
Daño suma pulmonar	0 (0-0)
Daño EVA cardiovascular	0 (0-0)
Daño suma cardiovascular	0 (0-0)
Daño EVA vascular	0 (0-0)
Daño suma vascular	0 (0-0)
Daño EVA endócrino	0 (0-0)
Daño suma endócrino	0 (0-0)
Daño EVA ocular	0 (0-0)
Daño suma ocular	0 (0-0)
Daño EVA infección	0 (0-0)
Daño suma infección	0 (0-0)
Daño EVA malignidad	0 (0-0)

Daño suma malignidad	0 (0-0)
Daño EVA otro	0 (0-0)
Daño suma otro	0 (0-0)
Daño EVA global	0 (0-5)
Extensión de daño	0.02 (0-0.1)
Gravedad de daño	0.03 (0-0.1)
Daño extendido	0 (0-1)
Health assessment questionnaire (HAQ)	1 (0-2)
Capilaroscopia anormal N (%)	87 (61.7%)
Pérdida de capilares N (%)	70 (49.6)
Capilares dilatados N (%)	69 (48.9)
Mega capilares N (%)	33 (23.4)
Hemorragias N (%)	32 (38.3)
Neo-vascularización N (%)	18 (12.8)
Ramificaciones N (%)	15 (12.9)
Trombosis N (%)	19 (13.5)
Calcinosis N (%)	19 (13.5)
Manifestaciones cutáneas N (%)	87 (62.1)
Disfagia N (%)	25 (17.9)
Úlceras cutáneas N (%)	21 (14.8)
Enfermedad pulmonar intersticial N (%)	35 (25.5)
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo	61 (56-68)
Presión sistólica de arteria pulmonar (mmHg)	30 (24-41)
Capacidad vital forzada (%)	61 (57-68)
Volumen espirado de 1 segundo/Capacidad vital forzada (%)	32 (26-40)
Neoplasia N (%)	4 (2.8)
Respuesta clínica completa/remisión N (%)	26 (18.4)

Muerte N (%)	6(4.2)
--------------	--------

**VIII.2. Los pacientes con MII muestran una proporción diferencial de todas las subpoblaciones de monocitos y aumento en su expresión de TLR 2 y 4, lo que correlaciona con actividad y características clínicas.** Como se muestra en la figura 4, los pacientes con MII activas con uso de prednisona (90.5 (86.8-92.9%) vs 80.85 (45.78-86.63),  $P=0.004$ ) y sin uso de prednisona (90.5 (86.8-92.9%) vs 76.5 (32.9-88.8),  $P=0.035$ ) tuvieron un menor porcentaje de monocitos clásicos y un mayor porcentaje de monocitos intermedios (4.49 (3.5-6.71) vs 13 (8.45-49.65),  $P=0.014$ ) y (4.49 (3.5-6.71) vs 17.1 (6.4-54.7),  $P=0.018$ ) en comparación con sujetos sanos.

**Figura 4.** Proporciones de monocitos y expresión de TLR de acuerdo con la actividad de la enfermedad y tratamiento inmunosupresor.

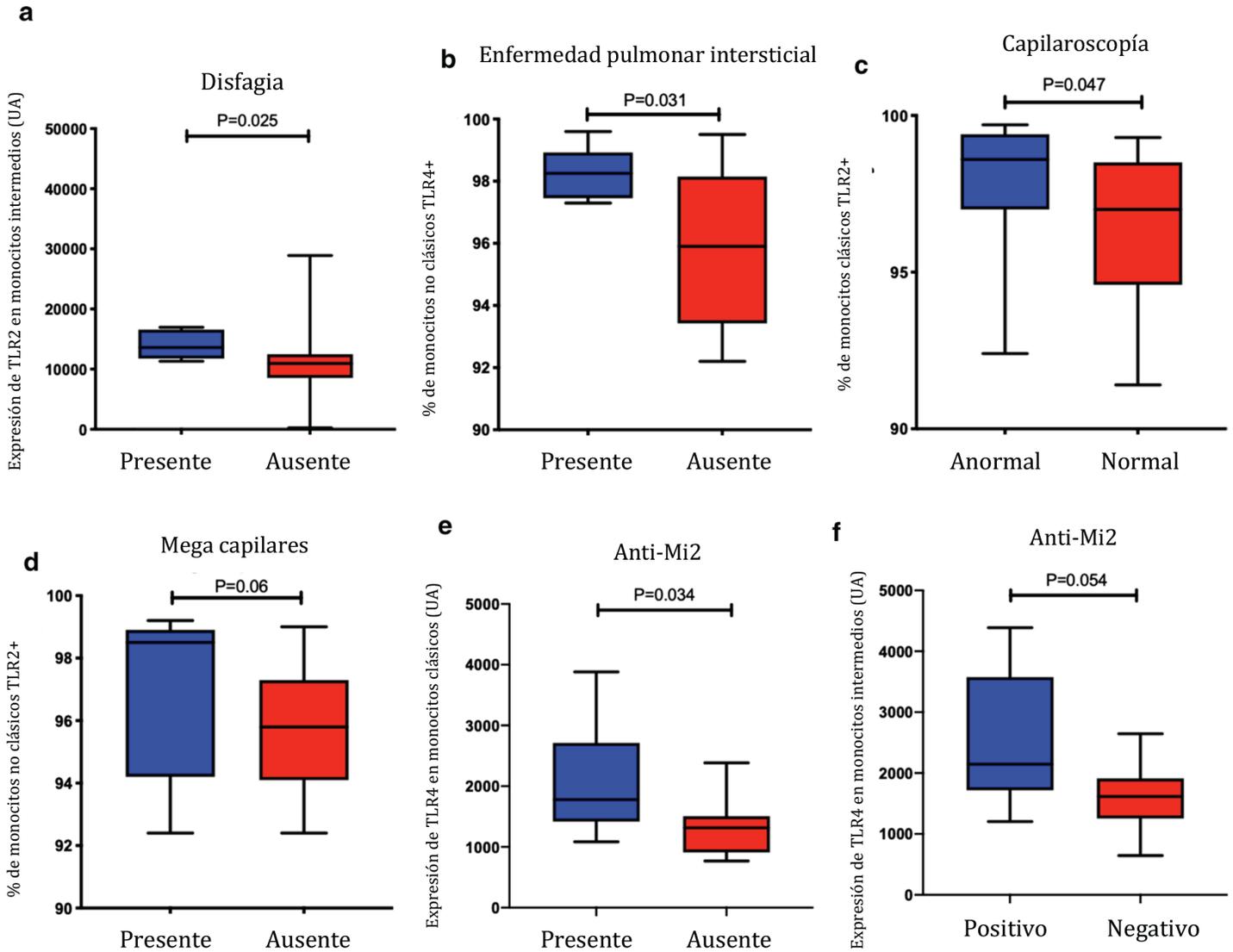


El número absoluto de monocitos clásicos correlacionó negativamente con el myositis disease activity assessment visual analogue scales (MYOACT) total ( $Rho=-0.429$ ,  $P=0.006$ ) y el myositis intention to treat activity index (MITAX) total ( $Rho=-0.355$ ,  $P=0.027$ ). Los monocitos clásicos de pacientes con MII activas y consumo de prednisona tuvieron una mayor expresión de TLR4 en comparación con controles sanos (1780 (1448-2409) vs 502 (412-832),  $P=0.001$ ). Los mismos resultados se observaron al comparar la expresión de TLR4 en pacientes en respuesta clínica completa sin consumo de prednisona (1758 (1430-2348) vs 502 (412-832),  $P=0.007$ ).

En cuanto a los monocitos intermedios, los pacientes con MII activas y uso de prednisona tuvieron una mayor expresión de TLR4 en comparación con controles sanos (2464 (1701-3105) vs 569 (483-837),  $P<0.0001$ ), al igual que aquellos activos sin prednisona (2039 (1273-2725) vs 569 (483-837),  $P=0.049$ ) y aquellos en respuesta clínica completa sin uso de prednisona (2250 (1823-2647) vs 569 (483-837),  $P=0.009$ ). En comparación con sujetos sanos, los pacientes con MII y actividad de la enfermedad con uso de prednisona tuvieron una mayor expresión de TLR4 (1598 (954-2243) vs 281 (237-353),  $P<0.0001$ ), al igual que aquellos activos sin uso de prednisona (1293 (1006-1896) vs 281 (237-353),  $P=0.007$ ) y en respuesta clínica completa (1243 (1118-1580) vs 281 (237-353),  $P=0.023$ ). El porcentaje de monocitos intermedios correlacionó con la EVA de actividad por parte del paciente ( $Rho=0.3$ ,  $P=0.05$ ) y la VSG ( $Rho=0.32$ ,  $P=0.061$ ).

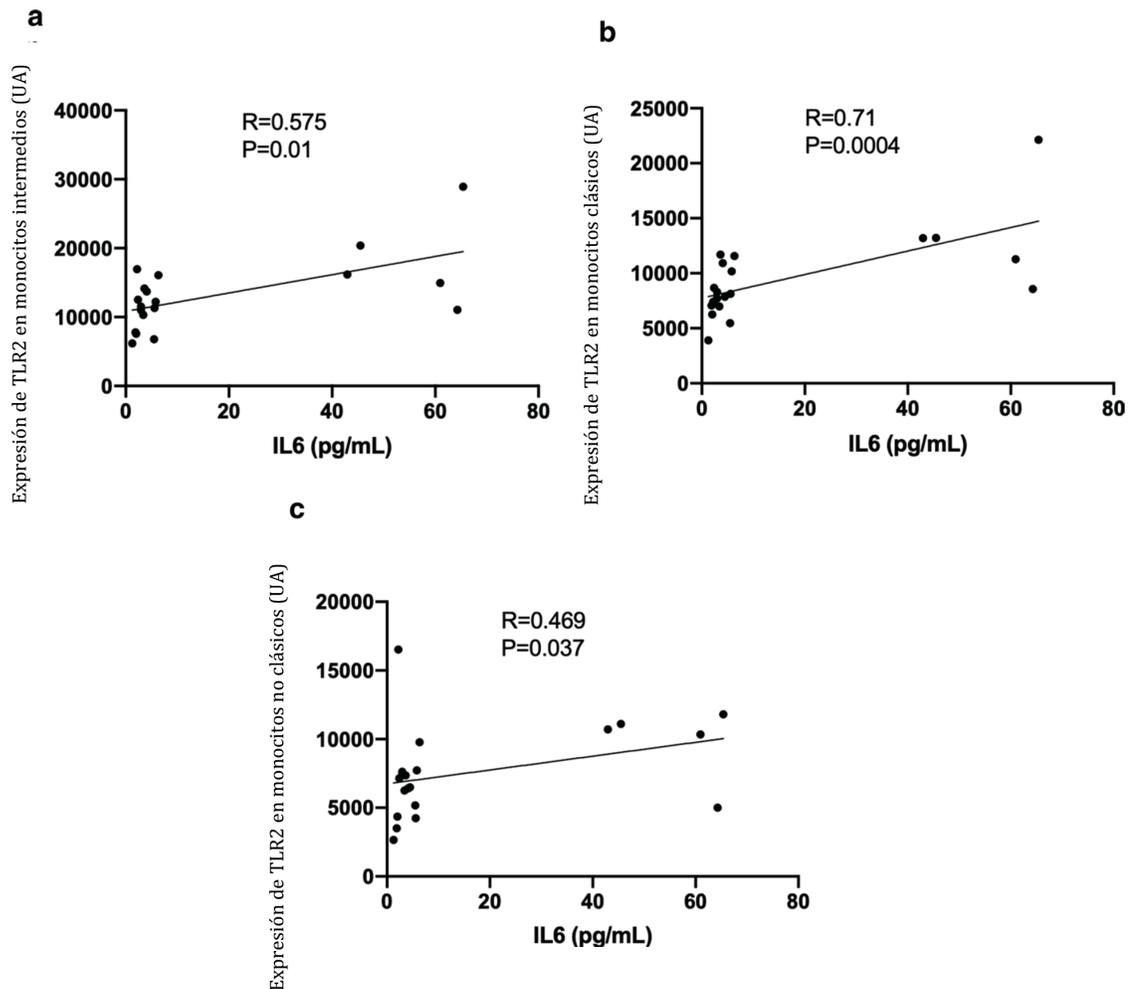
Como se muestra en la figura 5, los pacientes con disfagia, tuvieron una mayor expresión de TLR2 en monocitos intermedios (10964 (8543 vs 12487) vs 13605 (11761-16570),  $P=0.025$ ) y el porcentaje de monocitos clásicos TLR2+ correlacionó con el EVA gastrointestinal ( $Rho=0.377$ ,  $P=0.033$ ). Los sujetos con enfermedad pulmonar tuvieron un mayor porcentaje de monocitos no clásicos TLR4+ (98.25 (97.45-98.93) vs 95.9 (93.43-98.15),  $P=0.031$ ), mientras que los que tuvieron capilaroscopia anormal tuvieron un mayor porcentaje de monocitos clásicos TLR2+ (98.6 (97-99.4) vs 97 (94.6-98.5),  $P=0.047$ ), y los que presentaron mega capilares tuvieron una tendencia a un mayor porcentaje de monocitos no clásicos TLR2+ (98.5 (94.2-98.9) vs 95.8 (94.1-97.3),  $P=0.06$ ). Los pacientes con anti Mi2+, tuvieron una mayor expresión de TLR4 en monocitos clásicos (1778 (1419-2713),  $P=0.03$ ) e intermedios (1315 (910.8-1506),  $P=0.054$ ) (figura 5). El porcentaje de monocitos no clásicos TLR4+ correlacionó con la PCR ( $Rho=0.457$ ,  $P=0.075$ ) y con el EVA de enfermedad pulmonar (0.52,  $P=0.006$ ). El número absoluto de monocitos no clásicos TLR4+ correlacionó con la deshidrogenasa láctica (DHL) ( $Rho=0.7$ ,  $P=0.002$ ).

**Figura 5.** Expresión de TLR de acuerdo con las características clínicas de pacientes con MII.



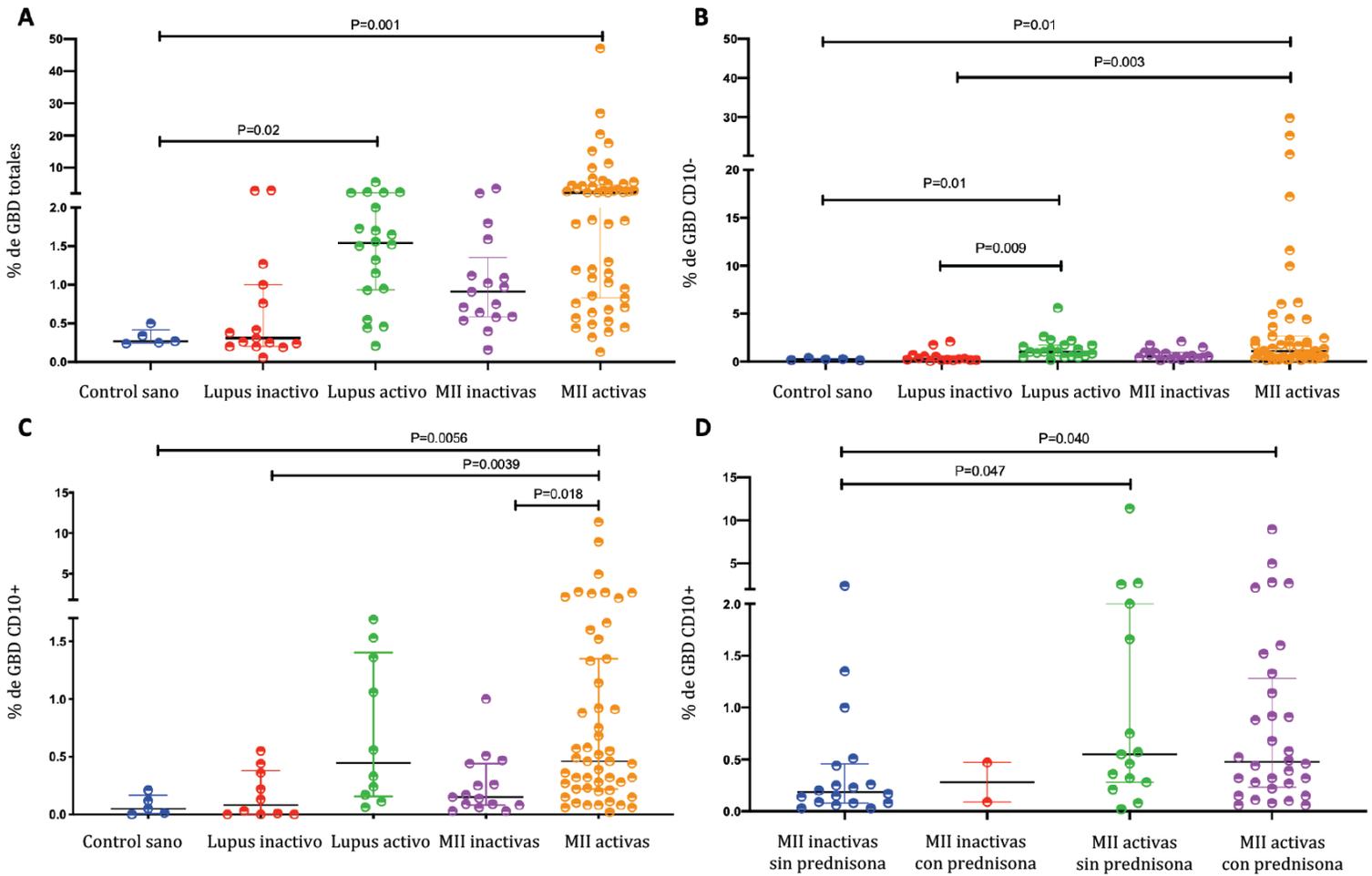
Los niveles de IL-6 correlacionaron con el número absoluto de monocitos intermedios ( $Rho=0.395$ ,  $P=0.034$ ), mientras que la expresión de TLR2 en todos los subtipos de monocitos correlacionó con los niveles de IL-6 (figura 6).

**Figura 6.** Correlación entre la expresión de TLR2 en subpoblaciones de monocitos y los niveles de IL-6.



**VIII.3. Los pacientes con MII tienen aumento en la proporción de GBD y NETs circulantes lo cual se asocia a actividad, daño acumulado y diversas características clínicas.** Los pacientes con MII y enfermedad activa tuvieron una mayor cantidad GBD totales, CD10- y CD10+ en comparación con los controles sanos (figura 7). Además, los pacientes con MII activa tuvieron una mayor cantidad de GBD CD10+ en comparación con los pacientes sin actividad y lupus inactivo. No encontramos diferencias en el porcentaje de GBD entre los diferentes fenotipos de miopatía. Previamente se había sugerido que el uso de prednisona aumenta el porcentaje de GBD en sangre periférica de pacientes con lupus [47], por lo que decidimos ajustar el análisis para el uso de prednisona, y encontramos que solo el porcentaje de LDG CD10+ seguía elevado en pacientes con MII activa, como se muestra en la figura 7, mientras que no había una diferencia significativa en el porcentaje de CD10- y total entre los grupos.

**Figura 7.** Proporción de GBD en relación a la actividad de la enfermedad y el tratamiento con prednisona.



Tanto los GBD totales como los CD10+ se asociaron con la presencia de actividad de la enfermedad. Con un punto de corte  $>2\%$ , el porcentaje de GBD totales tuvo una sensibilidad del 45% (31.85% -58.68%) y una especificidad del 93.33% (70.18% -99.66%) para el diagnóstico de enfermedad activa, con un área bajo la curva de 0.722 (0.5933-0.8512) y una razón de verosimilitud positiva de 6.73. Los pacientes con GBD totales por encima de este punto de corte tuvieron mayor probabilidad de presentar una capilaroscopia anormal (razón de momios (RM) 1.45 (1.01-2.08),  $P=0.048$ ) y pérdida de capilares (RM 2.27 (1.13-4.57),  $P=0.015$ ). Además, con un punto de corte  $>2\%$ , el porcentaje de GBD CD10+ fue capaz de diagnosticar actividad de la enfermedad con una alta especificidad del 80.00% (70.18%-99.66%), pero baja sensibilidad del 16.33% (8.51% -29.03%), con un área bajo la curva de 0.690 (0.5287-0.8522) y una razón de verosimilitud positiva de 2.44,  $P=0.026$ . Los sujetos con GBD CD10+ por encima de este punto de corte tuvieron con más frecuencia disfagia (RM 3.42 (1.14-10.309),  $P=0.07$ ) y anticuerpos anti MDA5 positivos (RM 6 (1.80-19.92),

P=0.022). Como se muestra en la tabla 2, los GBD totales y CD10+ mostraron una correlación significativa con las características clínicas, la actividad de la enfermedad y las medidas de daño en pacientes con MII.

**Table 2.** Correlaciones (Rho de Spearman) entre los porcentajes de los subtipos de GBD y las características de actividad y daño de pacientes con MII.

GBD totales		GBD CD10 <sup>-</sup>		GBD CD10 <sup>+</sup>	
EVA de actividad por el medico	0.322 P=0.007	EVA de actividad gastrointestinal	0.317 P=0.008	EVA de actividad por el medico	0.349 P=0.004
EVA de actividad por el paciente	0.359 P=0.003	Índice neutrófilo/linfocito	0.332 P=0.006	EVA de actividad por el paciente	0.354 P=0.003
MMT8	-0.406 P=0.001	Dosis de prednisona (mg/d)	0.382 P=0.026	MMT8	-0.443 P<0.0001
EVA de actividad gastrointestinal	0.409 P=0.001	Dosis de azatioprina (mg/d)	0.43 P=0.052	EVA de actividad gastrointestinal	0.374 P=0.002
EVA de actividad muscular	0.359 P=0.003	Complejos DNA-EN	0.324 P=0.054	EVA de actividad muscular	0.298 P=0.014
EVA de actividad extramuscular	0.303 P=0.01			CDASI crónico	0.331 P=0.006
MYOACT	0.376 P=0.002			EVA de actividad global	0.3 P=0.013
Extensión del daño	0.337 P=0.006			MYOACT	0.372 P=0.002
EVA de daño muscular	0.316 P=0.01			MITAX	0.404 P=0.001
EVA de daño cutáneo	0.37 P=0.002			EVA de daño muscular	0.386 P=0.001
EVA de daño gastrointestinal	0.3 P=0.014			EVA de daño cutáneo	0.376 P=0.002

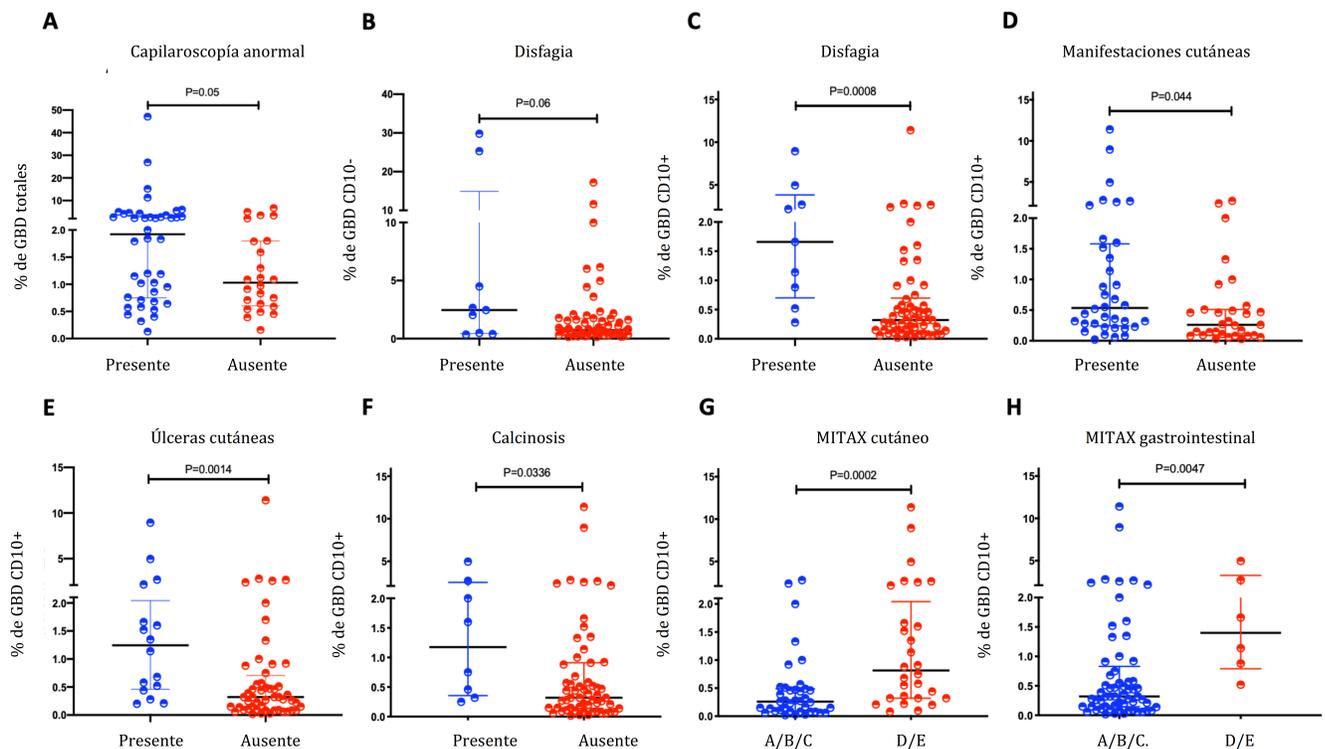
EVA de daño por infección	0.345 P=0.005		EVA de daño gastrointestinal	0.334 P=0.006
Gravedad de daño	0.3 P=0.014		EVA de daño muscular	0.3 P=0.012
Índice neutrófilo/linfocito	0.477 P<0.0001		EVA de daño global	0.353 P=0.004
DHL (U/L)	0.325 P=0.038		Extensión de daño	0.353 P=0.004
Alanino amino transferasa (U/L)	0.392 P=0.001		Gravedad de daño	0.334 P=0.006
Aspartato amino transferasa (U/L)	0.37 P=0.002		Índice neutrófilo/linfocito	0.349 P=0.004
Dosis de azatioprina (mg/d)	0.432 P=0.05		DHL (U/L)	0.351 P=0.024
IL-18 (pg/mL)	0.432 P=0.005		Alanino amino transferasa (U/L)	0.334 P=0.006
			Aspartato amino transferasa (U/L)	0.329 P=0.007
			Dosis de metotrexate (mg/d)	-0.37 P=0.043
			IL17A (pg/mL)	0.239 P=0.04
			IL18 (pg/mL)	0.323 P=0.042

Los GBD CD10+ correlacionaron inversamente con la dosis de metotrexate ( $r=-0.370$ ,  $P=0.043$ ), mientras que los CD10- mostraron una tendencia a una correlación positiva con la cantidad de complejos DNA-EN ( $r$

=0.324, P=0.05) y una correlación directa con la dosis de prednisona ( $r=0.382$ ,  $P=0.026$ ), la EVA de actividad de la enfermedad por el médico ( $r=0.317$ ,  $P=0.008$ ) y el índice de neutrófilos/linfocitos ( $r=0.332$ ,  $P=0.006$ ). Además, los GBD totales correlacionaron con la IL-18 sérica ( $r=0.432$ ,  $P=0.005$ ) y los GBD CD10+ con IL-17A ( $r=0.239$ ,  $P=0.04$ ) e IL-18 ( $r=0.323$ ,  $P=0.042$ ).

Después de estos hallazgos, analizamos si los pacientes con características clínicas distintivas tenían una proporción diferencial de GBD circulantes. Los sujetos con una capilaroscopia anormal tuvieron una mayor cantidad de GBD totales, mientras que aquellos con disfagia tuvieron un mayor porcentaje de GBD CD10- y CD10+ (figura 8). Además, los GBD CD10+ fueron más altos en pacientes con dermatosis, signos de vasculopatía incluyendo calcinosis y úlceras cutáneas, así como en aquellos con manifestaciones cutáneas y gastrointestinales más graves medidas a través del MITAX.

**Figura 8.** Proporción de los subtipos de acuerdo con las características clínicas de pacientes con MII.

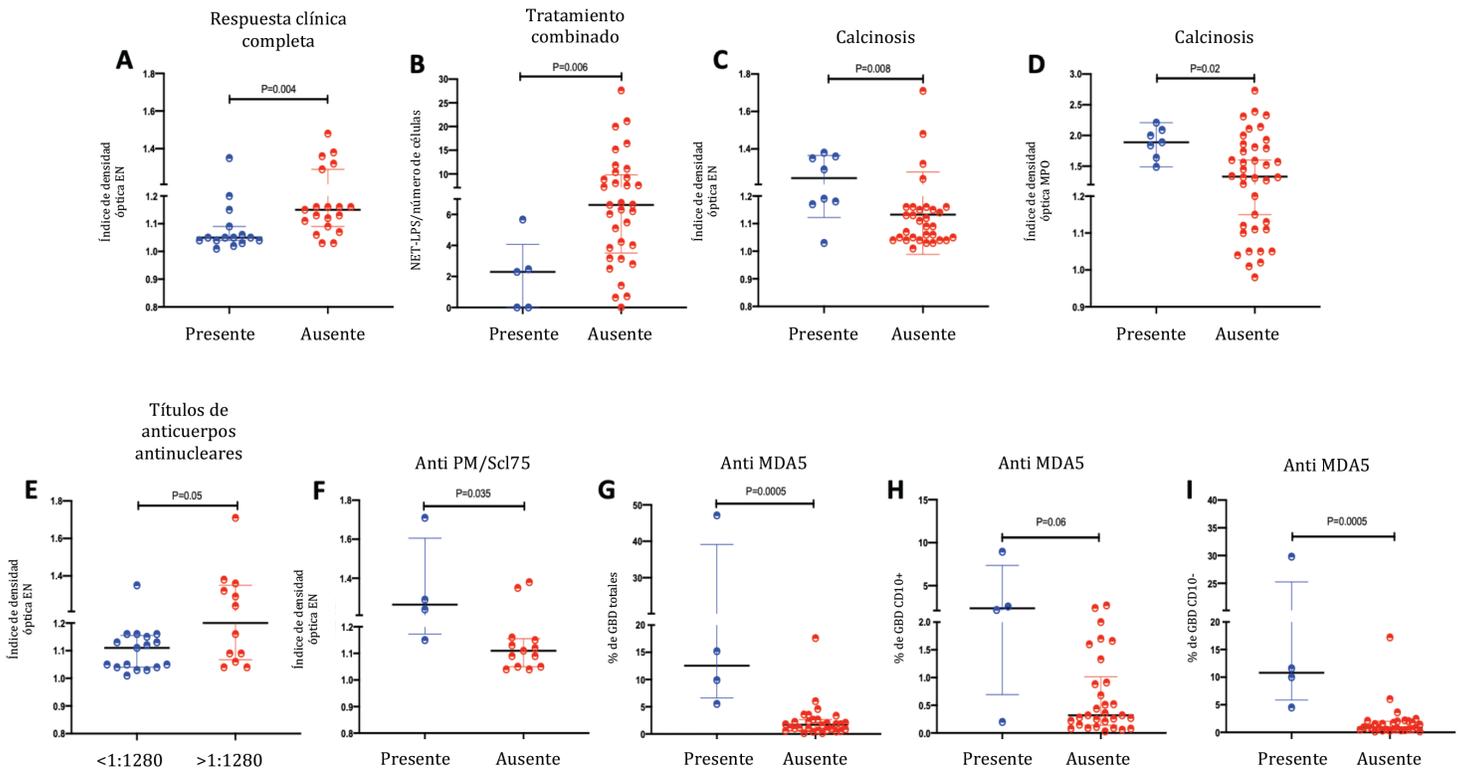


Estudios anteriores han demostrado que tanto los neutrófilos convencionales como los GBD de MII son propensos a la NETosis espontánea [48]. Además, en este estudio encontramos una correlación entre los GBD CD10- y las NETs circulantes. Por lo tanto, evaluamos si las NETs circulantes y la NETosis espontánea

e inducida por LPS *ex vivo* estaban relacionadas con las características clínicas y la terapia inmunosupresora de pacientes con MII. Como se muestra en la figura 9, los pacientes con calcinosis tuvieron una mayor cantidad de NETs circulantes. Además, la combinación de altos niveles de GBD CD10+ y complejos DNA-EN circulantes se relacionó con la presencia de úlceras cutáneas (RM 2.15 (1.01-4.69), P=0.05) y calcinosis (RM 2.55 (1.02-6.66), P=0.05). Los pacientes en respuesta clínica completa tuvieron cantidades menores de complejos DNA-EN. Los neutrófilos convencionales de pacientes bajo tratamiento combinado con azatioprina y metotrexate mostraron una menor capacidad para producir NETs después de estímulo con LPS. La cantidad de NETs espontáneas en neutrófilos convencionales correlacionó con la EVA de actividad gastrointestinal ( $r=0.389$ ,  $P=0.018$ ).

Posteriormente, analizamos si los GBD y NETs se encontraban relacionados con los autoanticuerpos. Los complejos de DNA-EN fueron mayores en pacientes con títulos de anticuerpos antinucleares más altos y en aquellos positivos para anti PM-Scl75. Además, el porcentaje de GBD totales, CD10- y CD10+ fue mayor en pacientes con anticuerpos anti MDA5 (figura 9).

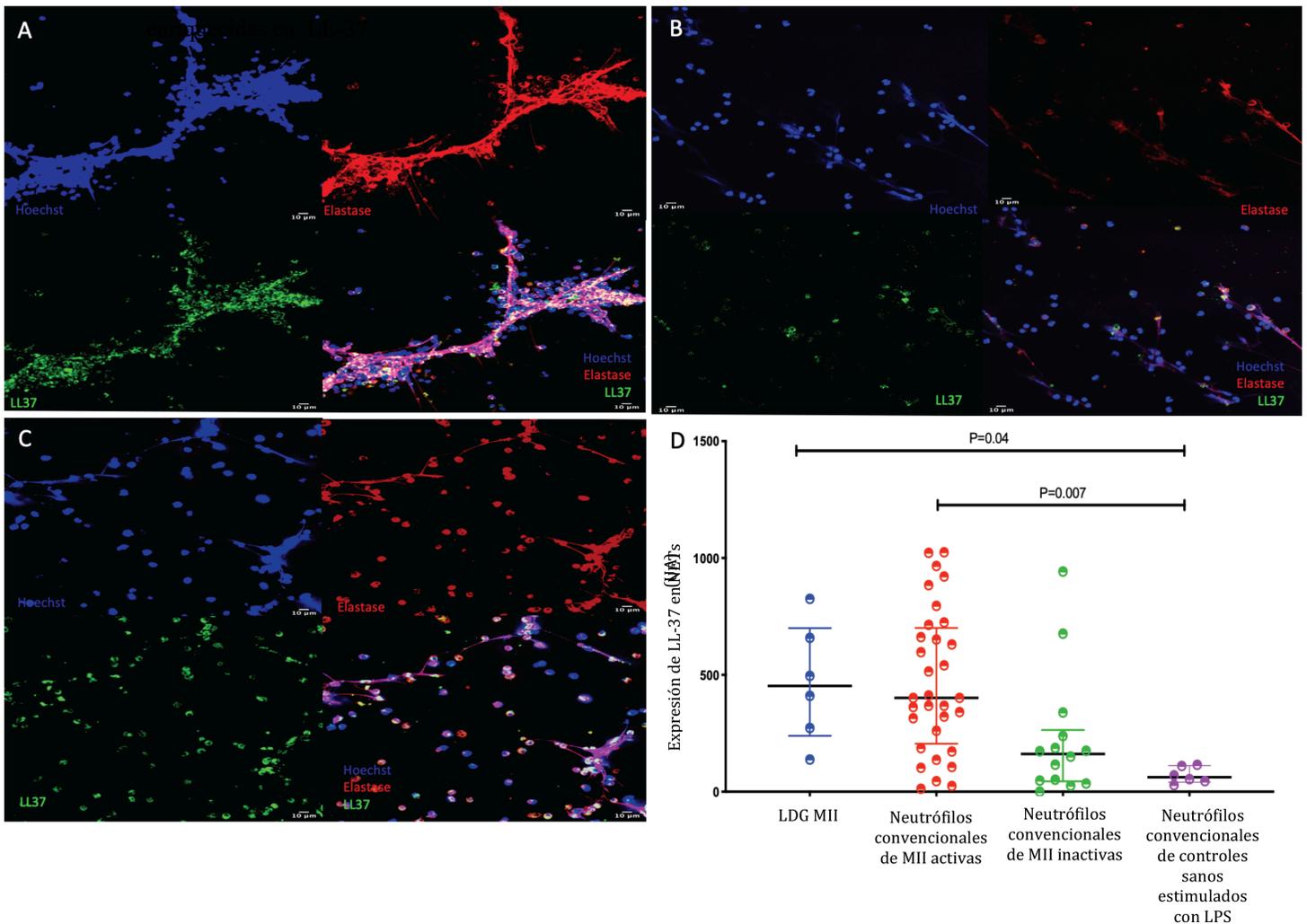
**Figura 9.** Cantidad de NETs circulantes, espontáneas e inducidas acorde a la presencia de diversas características clínicas y serológicas en pacientes con MII



**VIII.4. Las NETs de pacientes con MII contienen el péptido interferogénico LL-37.** Estudios previos han demostrado que una carga proteica diferencial en las NETs puede ser responsable del daño tisular en enfermedades autoinmunes [22] y se ha descrito una alta concentración del péptido interferogénico LL-37 en sangre periférica de pacientes con MII [49].

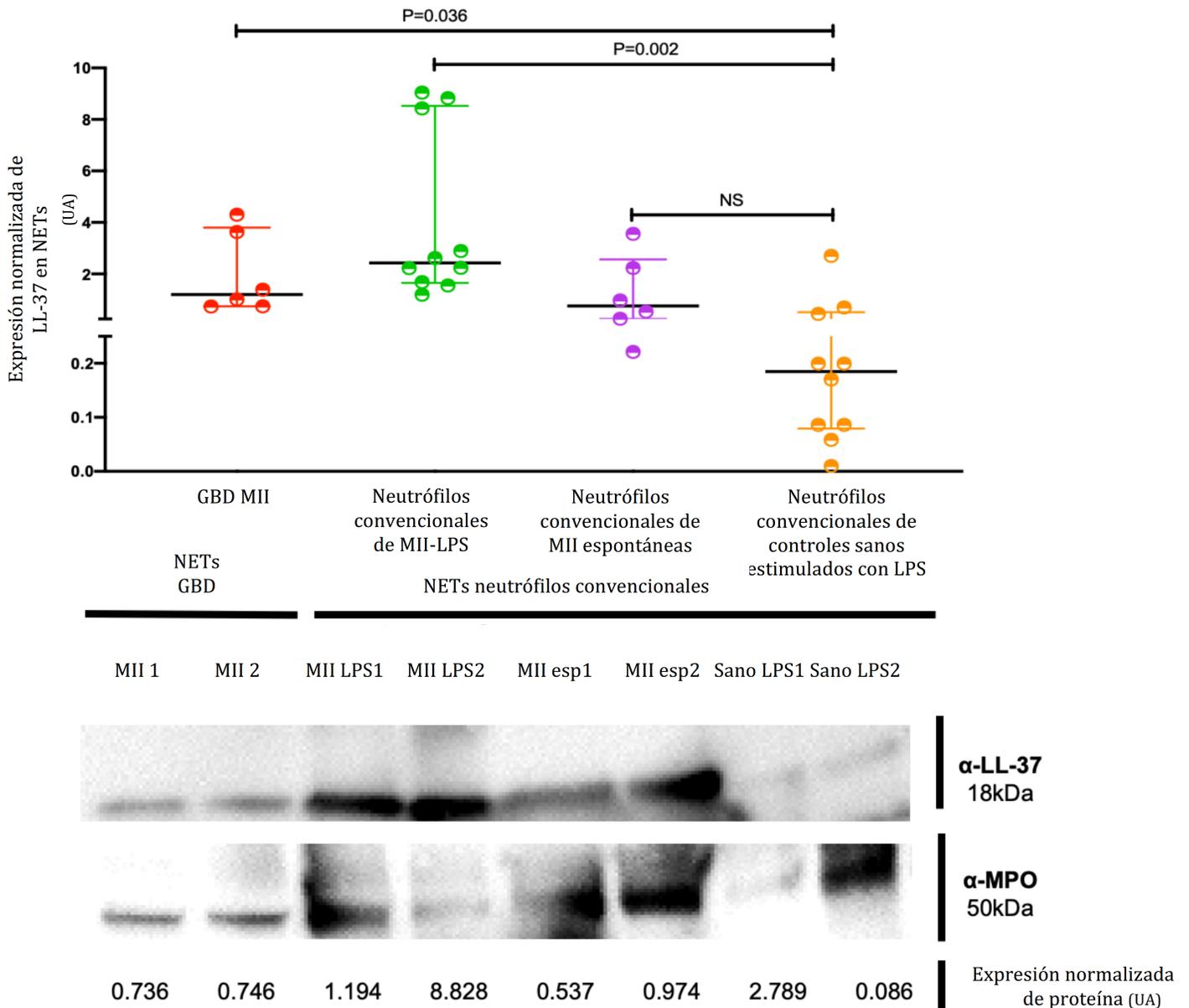
Para determinar si las NETs de MII eran una fuente de LL-37, evaluamos la expresión de este péptido en las NETs mediante inmunofluorescencia y western blot. Como se muestra en la figura 10, tanto los neutrófilos convencionales como los GBD de pacientes con MII y enfermedad activa contienen una gran cantidad de LL-37 en comparación con las NETs inducidas por LPS de los neutrófilos convencionales de donadores sanos.

**Figura 10.** Los GBD y neutrófilos convencionales de pacientes con DM activa producen NETs espontáneas



Cuando evaluamos la cantidad de LL-37 en las NETs espontáneas de neutrófilos convencionales y GBD de pacientes con MII, así como las NETs de neutrófilos convencionales inducidas por LPS de pacientes con MII y donadores sanos mediante western blot, encontramos una mayor expresión de LL-37 en las NETs de GBD y NETs de neutrófilos convencionales así como en NETs espontáneas de neutrófilos convencionales de pacientes con MII en comparación con NETs de neutrófilos convencionales estimulados con LPS de controles sanos (figura 11).

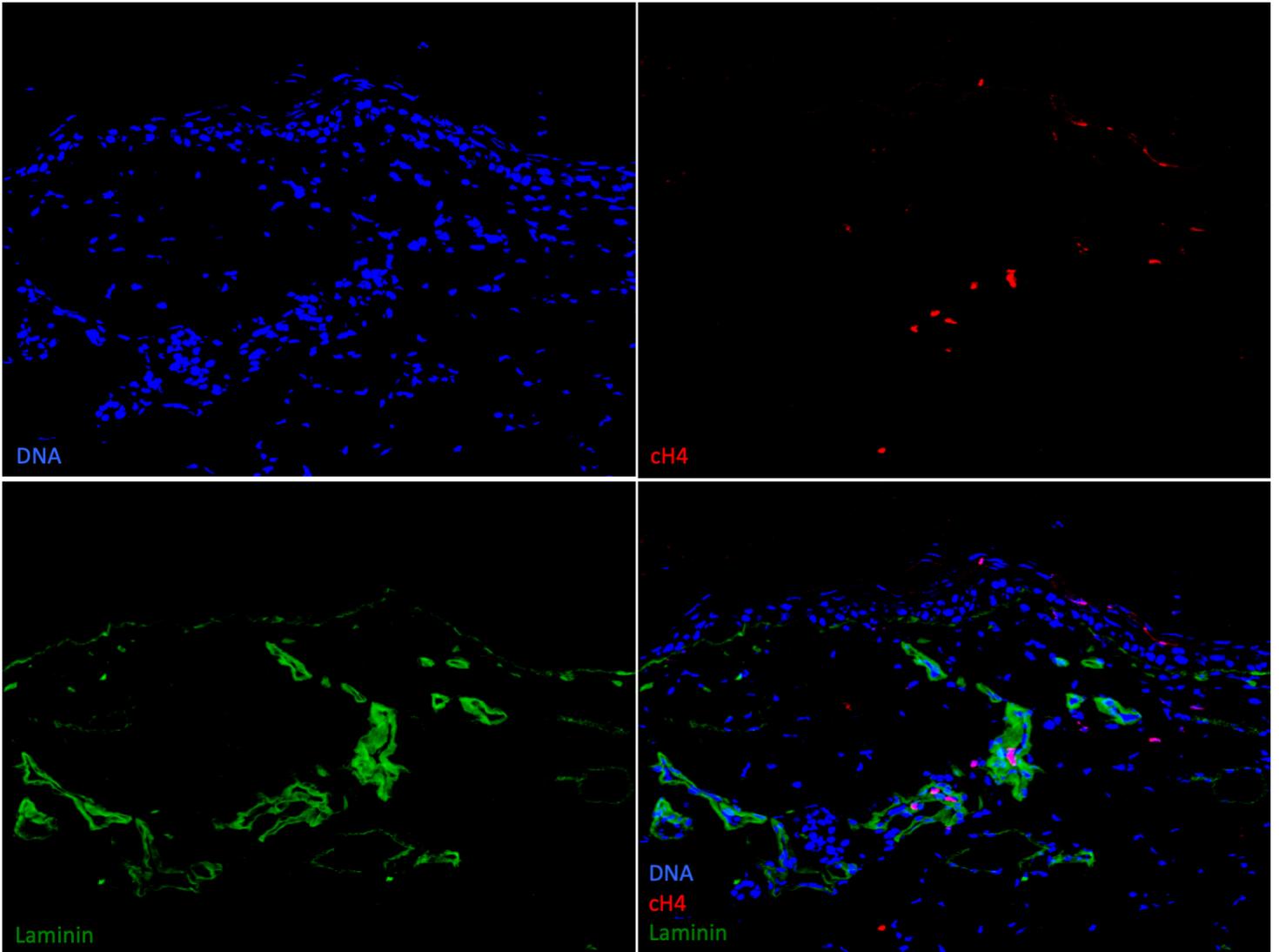
**Figura 11.** Expresión de LL-37 normalizada para la cantidad de MPO en NETs de pacientes con MII y neutrófilos convencionales de sujetos control estimulados con LPS.



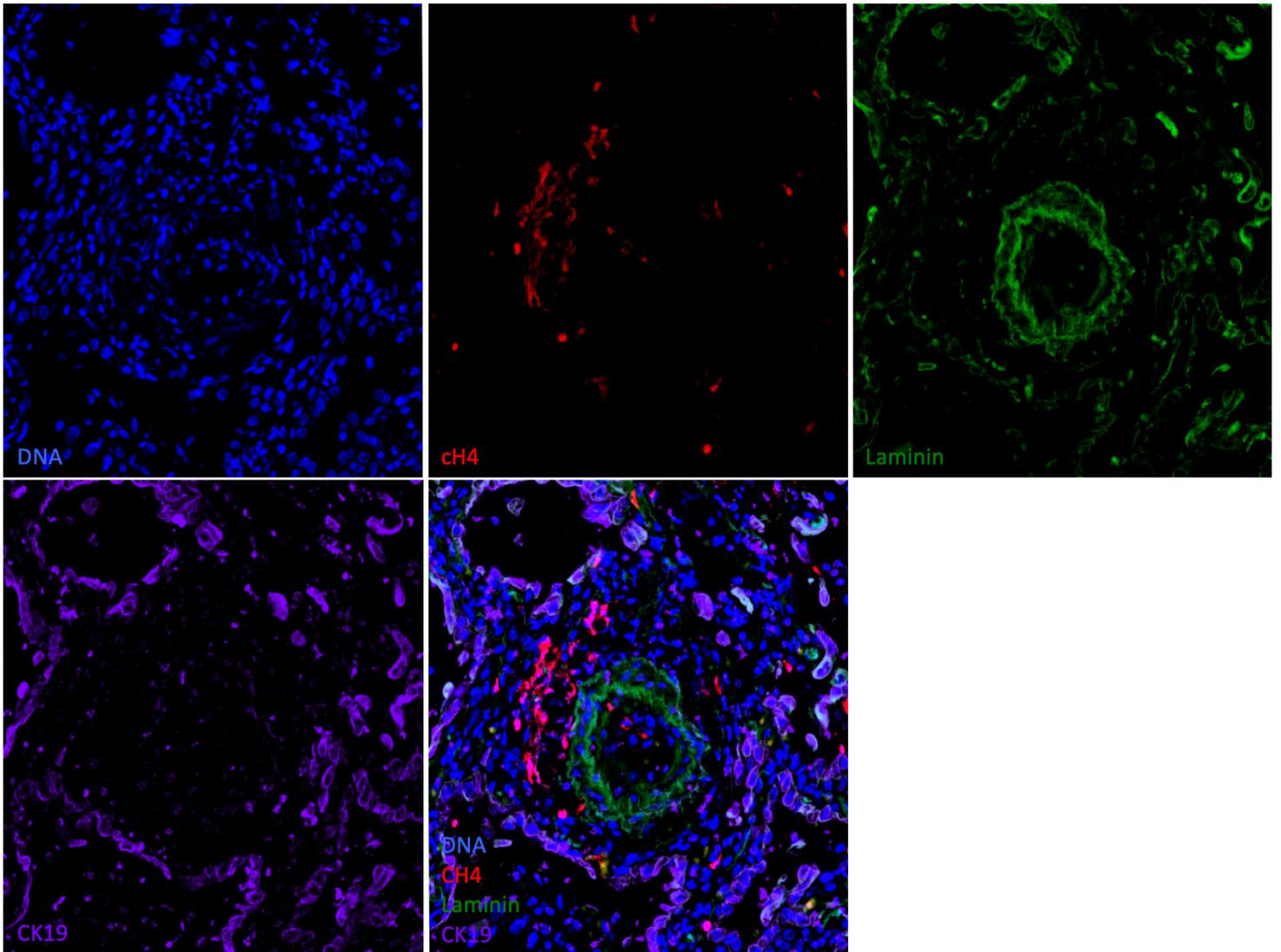
La expresión de LL-37 en NETs espontáneas de neutrófilos convencionales de pacientes con MII se correlacionó con los niveles de PCR ( $r=0.572$ ,  $P=0.008$ ) y con la EVA de la actividad de la enfermedad esquelética ( $r=0.442$ ,  $P=0.009$ ), mientras que la expresión de LL-37 en NETs inducidas por LPS de neutrófilos convencionales se correlacionó positivamente con la CPK ( $r=0.375$ ,  $P=0.038$ ) y la DHL ( $r=0.428$ ,  $P=0.047$ ).

***VIII.5. Los tejidos de pacientes con MII contienen NETs.*** Como se observa en las figuras 12-14, las biopsias de piel, músculo y pulmón de pacientes con MII tienen abundantes depósitos de complejos DNA-histona-4 citrulinada (NETs)

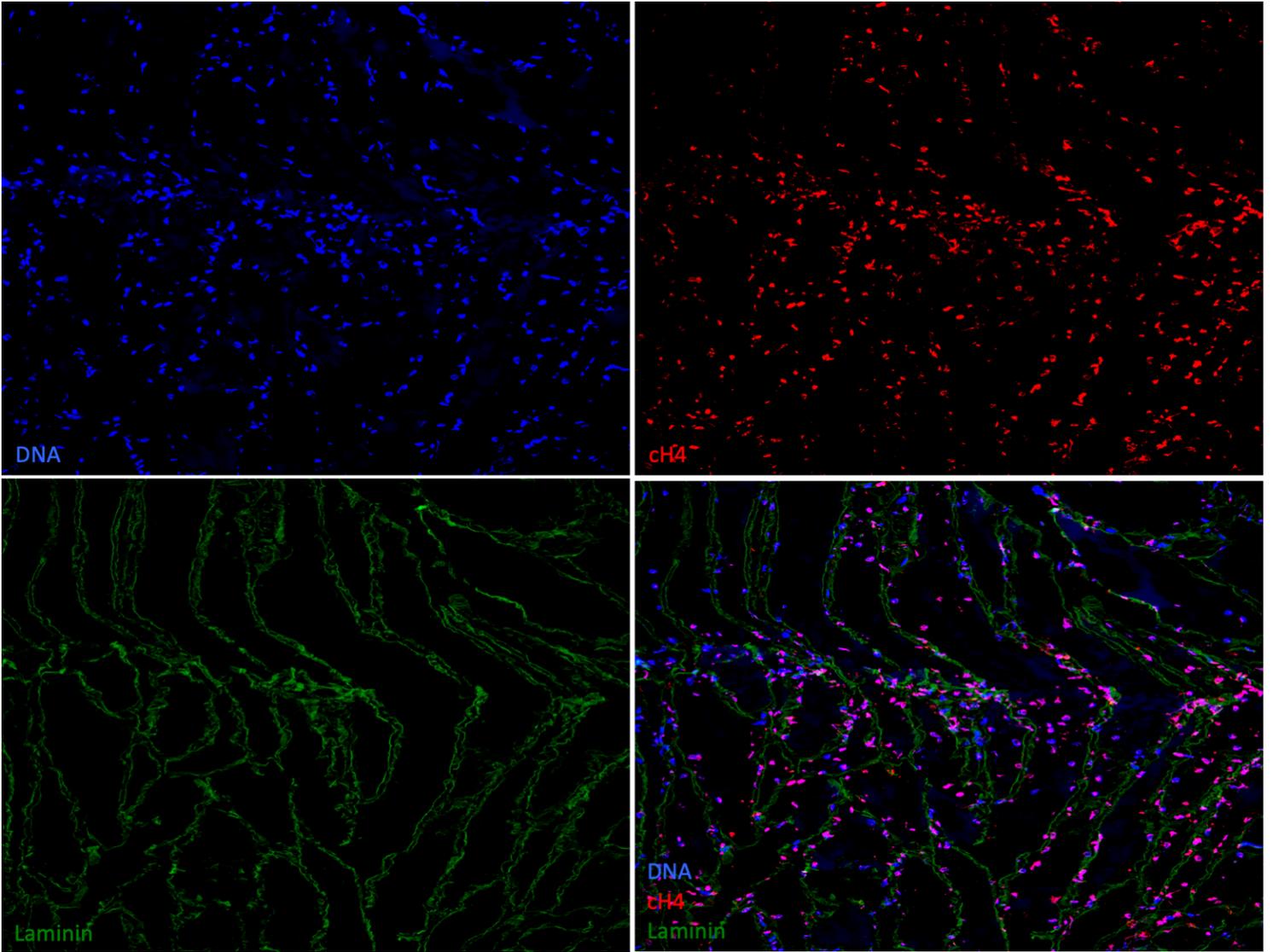
**Figura 12.** Depósito de NETs en el espacio perivascular de la dermis de una paciente con dermatomiositis MDA5+.



**Figura 13.** Depósito de NETs en el espacio perivascular de una biopsia pulmonar de un paciente con DM anti MDA5+

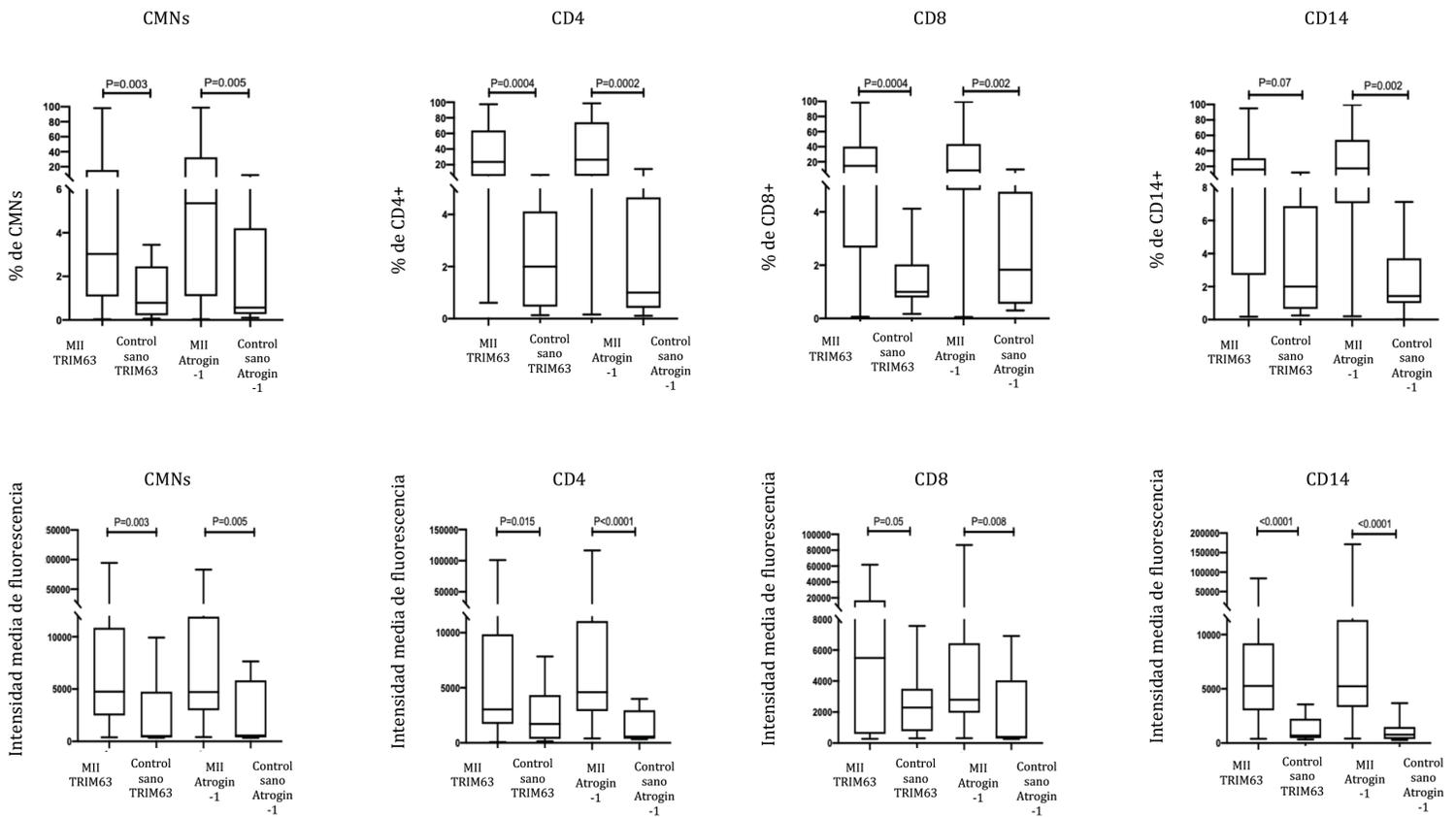


**Figura 14.** Depósito de NETs en el músculo de una paciente con DM anti MDA5+



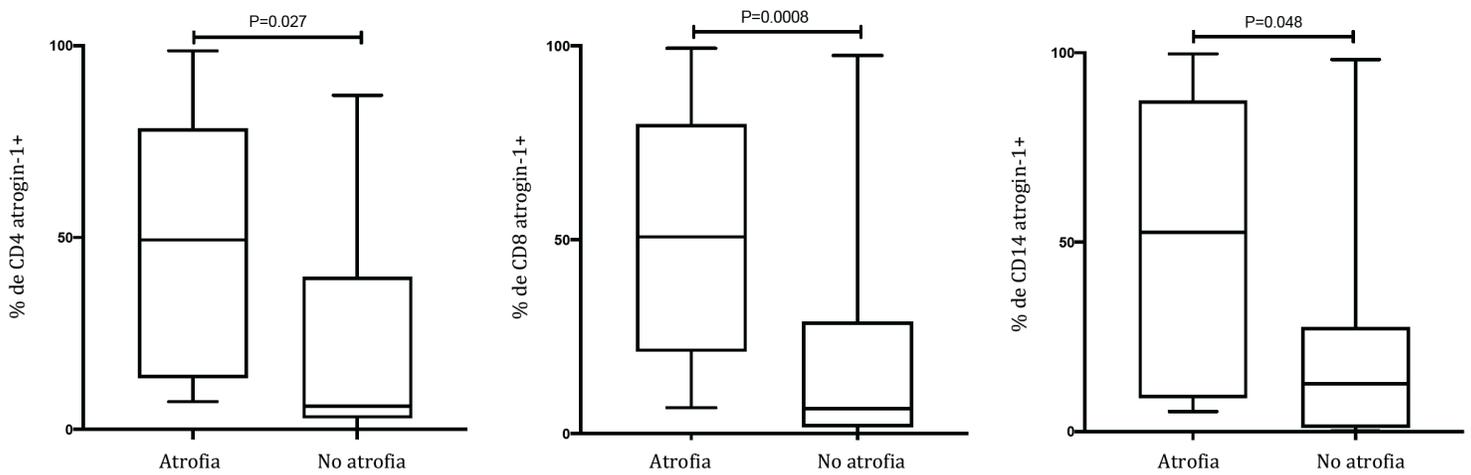
**VIII.6. Los pacientes con MII tienen un aumento en la expresión de TRIM63 y Atrogin-1 en células mononucleares (CMNs) de sangre periférica.** Mediante citometría de flujo, observamos un aumento en la proporción y expresión de las E3 ligasas de ubiquitina atrogin-1 y TRIM63 en diversas subpoblaciones de CMNs (figura 15).

**Figura 15.** La proporción y expresión de las E3 ligasas de ubiquitina TRIM63 y atrogin-1 fue mayor en CMNs de pacientes con MII en comparación con controles sanos.



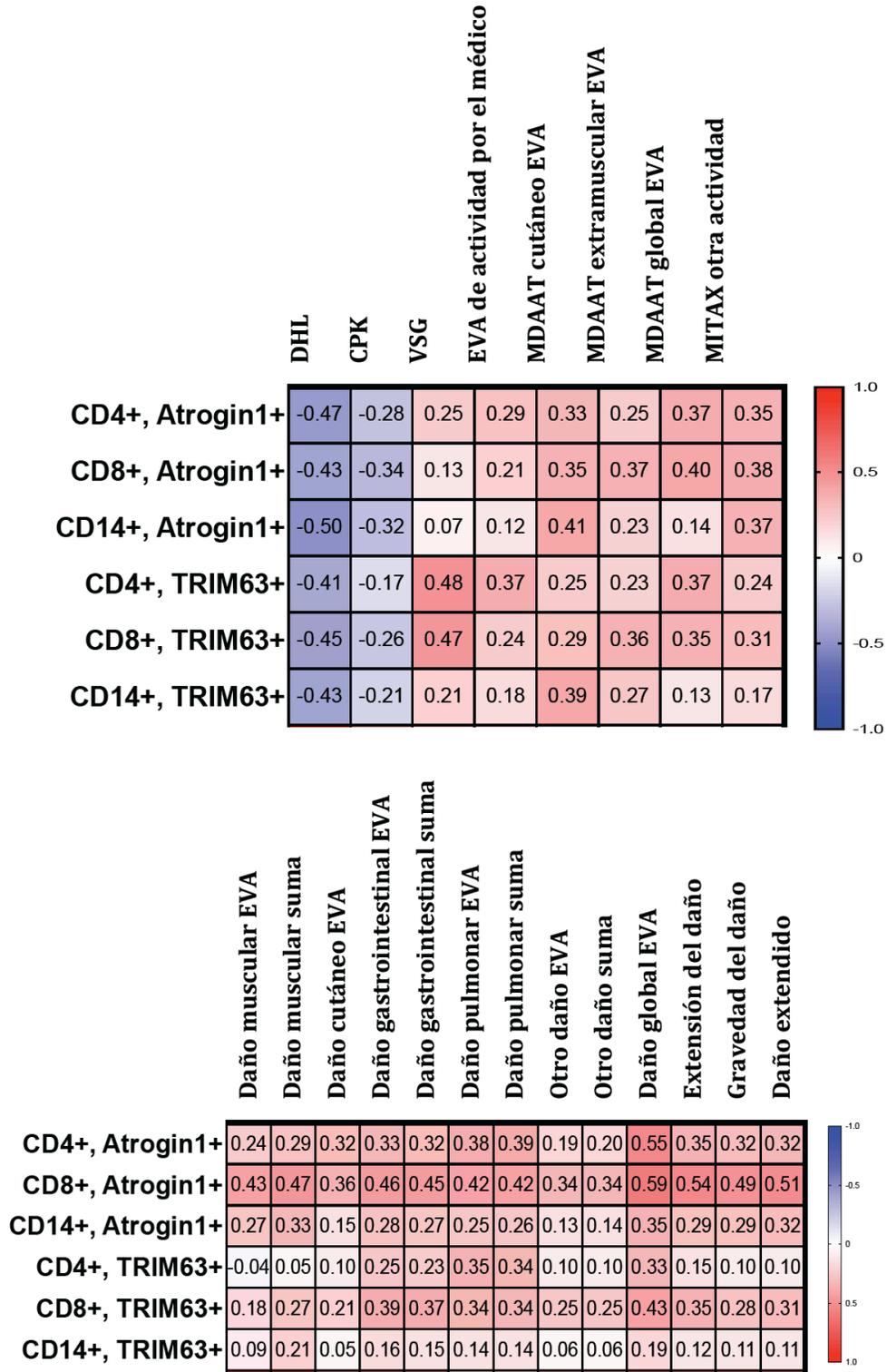
**VIII.7. Los pacientes con MII y atrofia muscular clínicamente determinada tienen una mayor expresión de Atrogin-1 en CMNs.** El porcentaje de CMNs que expresaron Atrogin-1 fue mayor en pacientes con MII que tuvieron atrofia clínicamente determinada como se muestra en la figura 16. No se observaron diferencias en la IMF de atrogin-1 en las diferentes subpoblaciones ni en la proporción o expresión de TRIM63 en pacientes con y sin atrofia muscular.

**Figura 16.** Expresión diferencial de atrogin-1 en diversas subpoblaciones de CMNs en pacientes con y sin atrofia clínicamente determinada.



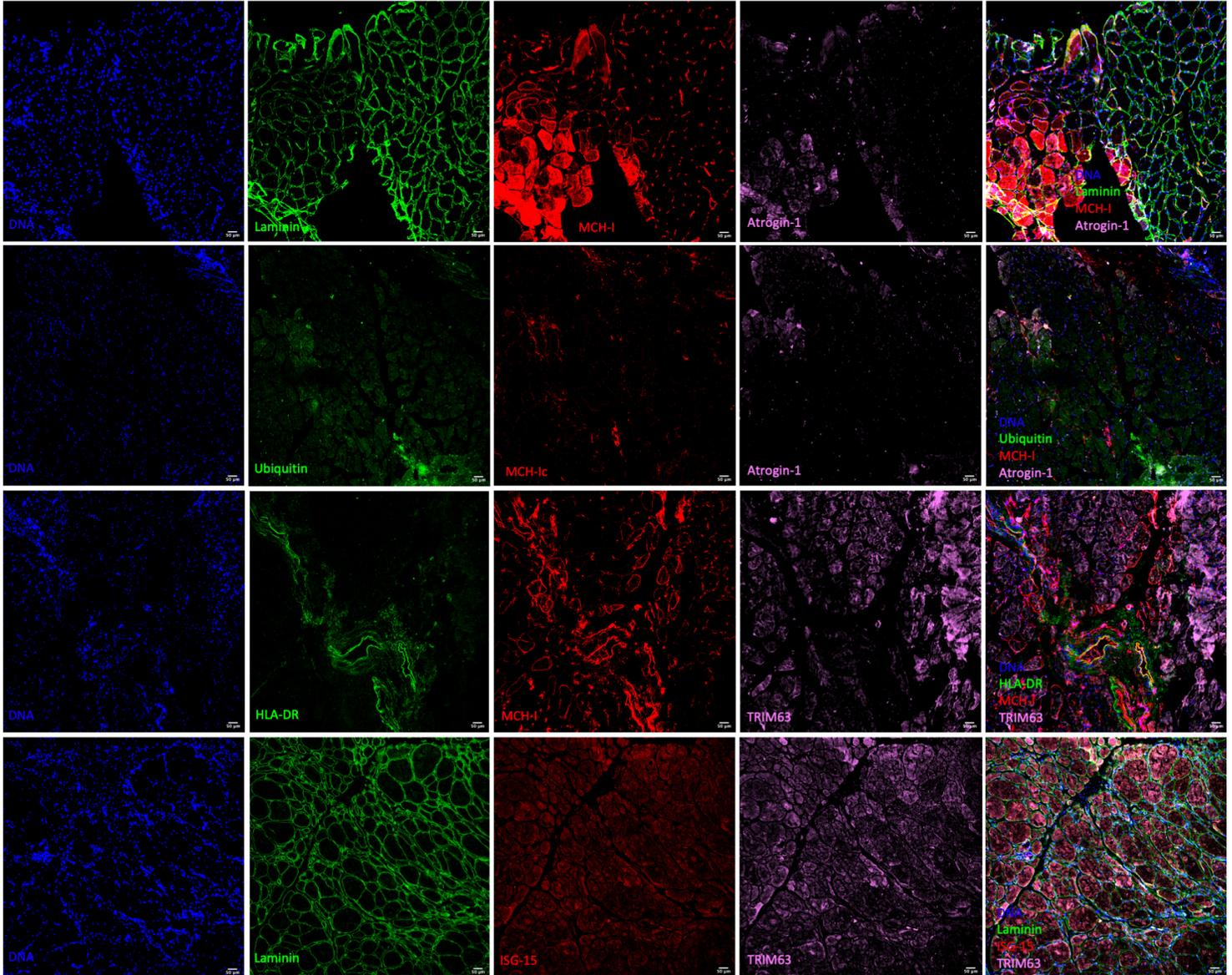
**VIII.8. La expresión de TRIM63 y atrogin-1 en subpoblaciones de CMNs correlaciona con múltiples parámetros de actividad y daño.** Como se muestra en la figura 17, la proporción de subpoblaciones de CMNs con expresión de TRIM63 y Atrogin-1 correlacionó con múltiples parámetros de actividad y daño.

**Figura 17.** Matrices de correlaciones entre la proporción de las subpoblaciones de CMNs con expresión de las E3 ligasas TRIM63 y atrogin-1 y los parámetros de actividad y daño. Se muestran las correlaciones con  $P < 0.05$ .



**VIII.9. Las biopsias de pacientes con MII muestran expresión de TRIM63 y Atrogin-1 junto con las proteínas relacionadas con interferones.** Como se muestra en la figura 18, las biopsias de pacientes con MII tienen expresión de TRIM63 y Atrogin-1, especialmente aquellas con aumento en la expresión de proteínas relacionadas con interferones. Mediante microscopía confocal, se observó expresión de TRIM63 en todas las miofibras y de Atrogin-1 en las áreas de atrofia perifascicular. También se observó expresión de las proteínas reguladas por interferón tipo I como ISG-15 y tipo II como HLA-DR. De igual forma, se detectó la presencia de ubiquitina en las miofibras de pacientes con MII.

**Figura 18.** Expresión de las E3 ligasas de ubiquitina TRIM-63, atrogin-1 así como de las proteínas reguladas por interferón en biopsias musculares de pacientes con MII.



## ***IX. Discusión.***

El presente estudio muestra que los pacientes con MII tienen alteraciones en las proporciones de monocitos con expresión de TLR2 y TLR4 y de GBD, lo que correlaciona con las características clínicas de actividad y daño. Además, los neutrófilos convencionales y GBD de pacientes con MII son capaces de producir NETs espontáneamente, las cuales se encuentran en circulación y en tejido y contienen el péptido interferogénico LL-37. Finalmente, observamos que las ligasas de ubiquitina TRIM63 y Atrogin-1 se encuentran expresadas en CMNs y músculo de pacientes con MII en relación a las proteínas inducidas por interferón tipo I y II.

De manera similar a nuestros resultados, se han descrito cantidades menores de monocitos CD14++ en pacientes con esclerosis múltiple (EM) [50] y artritis idiopática juvenil (AIJ) con entesitis [51], así como un mayor porcentaje de monocitos CD16+ intermedios y no clásicos con fenotipo pro-inflamatorio en pacientes con EM [52], neuromielitis óptica [53], AR [17], lupus [54], vasculitis-ANCA [55], sarcoidosis [56], nefropatía por IgA [57], AIJ con entesitis [51], DM1 [58], tromboembolismo [59], aterosclerosis y EVC [60]. Asimismo, el número absoluto de monocitos clásicos correlacionó inversamente con la actividad de la enfermedad (MYOACT y MITAX), lo cual coincide con datos previos en pacientes con AR, donde hay un mayor porcentaje de monocitos intermedios durante la actividad de la enfermedad y una mayor proporción de monocitos clásicos durante la remisión [61] y confirma la proporción diferencial de monocitos relacionada con la actividad de la enfermedad..

Dado que se sabe que el tratamiento con prednisona aumenta los monocitos intermedios y disminuye los monocitos no clásicos [62], decidimos ajustar nuestro análisis para el consumo de prednisona, confirmando que nuestros resultados no son una consecuencia del tratamiento con dicho fármaco. No obstante, no observamos diferencias con respecto al tratamiento inmunosupresor, lo cual coincide con lo previamente reportado en un estudio que demostró que la terapia inmunosupresora no alteró las subpoblaciones de monocitos [62].

Los monocitos intermedios y no clásicos se han descrito como pro-inflamatorios [63]. Los monocitos intermedios poseen características fagocíticas y pro-inflamatorias, ya que secretan IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  [54] e IL-6 [64], y expresan mayores cantidades de TLR 2, 4 y 5 que cualquier otro subconjunto, además, expresan CD80, CD86, HLA-DR y son capaces de diferenciarse a macrófagos M1, promover una respuesta Th17 [54] y favorecer la proliferación de células T debido a su mayor expresión de CD40 [51]. Por el contrario, los

monocitos no clásicos responden a CX3CL1, que promueve su función de patrullaje en los vasos sanguíneos, la migración transendotelial, la supervivencia y el reclutamiento en tejidos [15]. En modelos animales de lesión muscular, los monocitos no clásicos se reclutan en el músculo después del daño tisular para promover su reparación [65]. Por lo tanto, una expansión de monocitos intermedios puede contribuir al entorno proinflamatorio en pacientes con MII, mientras que la mayor proporción de monocitos no clásicos podría ser un reflejo del daño muscular en estos pacientes.

Por otra parte, encontramos que en pacientes con MII y capilaroscopia anormal, hay una mayor cantidad de monocitos clásicos y no clásicos que expresan TLR2. Estos datos concuerdan con el papel de los monocitos en el daño endotelial en otras enfermedades autoinmunes [66]. En el momento basal, los monocitos patrullan el endotelio, pero en pacientes con AR y lupus, se demostró que los monocitos activados contribuyen al daño vascular [66] y que TLR2 es un factor clave en la vasculopatía por hiperreactividad plaquetaria y trombosis acelerada [67] lo que podría explicar la asociación entre monocitos y capilaroscopia anormal en sujetos con MII.

Además, observamos un mayor porcentaje de monocitos no clásicos en pacientes con disfagia y una mayor proporción de monocitos no clásicos TLR4+ en sujetos con EPI. La mayor proporción de monocitos no clásicos en pacientes con disfagia puede reflejar un daño tisular más intenso, ya que se sabe que este subconjunto de monocitos se recluta después de una lesión muscular [65]. Acorde con nuestros resultados, se ha demostrado que la deficiencia de TLR4 disminuye la inflamación pulmonar y la fibrosis en la lesión pulmonar inducida por bleomicina [68], apoyando la relación entre TLR4 y EPI. La mayor expresión de TLR4 en todos los subconjuntos de monocitos de pacientes con MII y la expresión diferencial de TLR2 según diversas características clínicas sugiere una respuesta incrementada a los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y a patógenos (PAMPs) en estos pacientes.

De igual forma, encontramos que la expresión de TLR2 en todos los subconjuntos de monocitos se correlacionaba con la IL-6 sérica. Se sabe que los monocitos CD16+ que expresan TLR2 secretan TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-1Ra e IL-10 después del estímulo con ácido lipoteicoico [69] confirmando el perfil proinflamatorio de estas células en respuesta a los PAMPs. Por otro lado, los monocitos no clásicos secretan TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-1 después de estímulo con LPS [63], lo que apoya la relación entre la mayor

expresión de TLR4 e IFN-gamma sérico, ya que se sabe que la IL-12 promueve la secreción de IFN-gamma [70].

La mayor expresión de TLR2 y 4 en monocitos puede producir una respuesta inflamatoria más intensa en pacientes con MII. Las células TLR4+ se encuentran en el perimio de pacientes con DM [71]. Los pacientes con anticuerpos anti-Mi2 se caracterizan por una intensa miositis y un abundante infiltrado inflamatorio en la biopsia muscular [72]. En este sentido, TLR4 se sobre-expresa en células musculares de pacientes con DM lo que contribuye a la debilidad muscular [3]. Esto respalda nuestros datos, ya que encontramos una mayor expresión de TLR4 en monocitos de pacientes con anticuerpos anti-Mi2. La importancia de los TLR en la fisiopatología de MII se destaca en el modelo animal de miositis inducida por proteína de fusión expresada en bacterias (histidil tRNA sintetasa). En este modelo, la deficiencia de TLR2 y TLR4 disminuye la gravedad de la miositis inducida por HRS en comparación con las cepas B6 deficientes únicamente de TLR2 o TLR4 [73]

Finalmente, se sabe que las células musculares de pacientes con MII expresan TLR4 y que existe una mayor expresión de TLR2, TLR4, TLR9 en células mononucleares y macrófagos de biopsias musculares en estos sujetos [71]. Además, se ha detectado una mayor cantidad de transcritos de TLR2, TLR4, TLR9, IFN- $\gamma$ , IL4, IL17 y TNF- $\alpha$  en el tejido muscular y la expresión de TLR4 y TLR9 se correlaciona con IFN- $\gamma$ , IL4, IL17 y TNF $\alpha$  [71]. Esto coincide con nuestros resultados, ya que encontramos una correlación positiva entre la expresión de IFN-gamma y TLR4 en monocitos no clásicos. En biopsias musculares, la expresión de TLR4 correlaciona con la concentración de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 and TNF- $\alpha$  [71]. Por tanto, el entorno pro-inflamatorio en el músculo de pacientes con MII se refleja en las alteraciones de las subpoblaciones de monocitos y su mayor expresión de TLR2 y 4.

Con respecto a los neutrófilos, los GBD son un subconjunto especial de neutrófilos con un fenotipo activado que se manifiesta a través de su mayor expresión de CD11b y CD66b y un aumento en la producción de NETs espontáneas [74]. Además, se han detectado GBD CD10+ y NETs circulantes en pacientes con MII de inicio juvenil [48], en donde se encontró una correlación entre la actividad pulmonar, vascular y muscular y las NETs circulantes [48], así como entre GBD CD10+ y vasculopatía medida como pérdida de capilares del lecho ungueal [48]. Aunque anteriormente se demostró que los GBD CD10+ de sujetos sanos tratados con GM-CSF inducían una disminución de las respuestas de las células T (proliferación y síntesis de IFN-gamma)

[75], la mayoría de los estudios han demostrado que las GBD de pacientes con enfermedades autoinmunes se correlacionan con la actividad de la enfermedad [74]. Además, Rahman *et al*, demostraron que los GBD en pacientes con lupus están correlacionadas con la firma del interferón y no muestran capacidad reguladora [21].

En este estudio, observamos que en pacientes con MII, los GBD están elevados independientemente del tratamiento con prednisona y se correlacionan con la actividad de la enfermedad y el daño acumulado; lo que sugiere que la mayor cantidad de GBD circulantes no es el resultado de la demarginación de estas células del endotelio como sugirieron Kegerreis *et al* [76] y confirma su involucramiento en la fisiopatogenia de la enfermedad.

Un estudio previo de 48 pacientes con DM demostró un aumento de GBD y LL-37 plasmático en pacientes con EPI [77]. Además, se ha encontrado disminución en la capacidad del suero de pacientes con MII para degradar las NETs *in vitro* y un aumento en la cantidad de DNA y LL-37 circulantes en pacientes con anti MDA5 [78], lo cual coincide con los hallazgos del presente estudio.

De igual forma, encontramos una correlación entre los GBD y la IL-18. Esta citocina es el producto de la activación del inflammasoma NLRP3, que se ha encontrado sobre-expresado en el músculo de pacientes con MII [79], principalmente en células dendríticas y macrófagos [79] y es un sello distintivo de la enfermedad activa [79]. Esta citocina promueve el reclutamiento de neutrófilos [79] y puede representar la conexión entre la activación aumentada del inflammasoma en el músculo y la granulopoyesis incrementada que conduce a un mayor porcentaje de GBD en sangre periférica. Además, encontramos una correlación entre IL-17A y GBD. Esto concuerda con resultados anteriores que muestran que los GBD de los pacientes con lupus secretan IL-17 durante la NETosis [23], destacando su actividad pro-inflamatoria en el contexto de autoinmunidad.

En nuestro estudio, encontramos que los GBD y neutrófilos convencionales de pacientes con MII sufren NETosis espontánea *ex vivo*, lo cual puede contribuir directamente al daño tisular. Además, se ha descubierto que las NETs están relacionadas con el daño tisular [23], lo cual coincide con nuestros hallazgos en donde observamos el depósito de NETs en tejido pulmonar, cutáneo y muscular de pacientes con MII.

Otro mecanismo de daño de GBD en pacientes con enfermedades autoinmunes incluye daño endotelial. Interesantemente, encontramos que los pacientes con MII con signos de vasculopatía que incluyen úlceras cutáneas, calcinosis y una capilaroscopia anormal tienen una mayor cantidad de NETs y GBD. Se sabe que

la incubación de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) con NETs de GBD induce cambios morfológicos, así como la acumulación de metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) en la superficie de estas células [79]. Además, cuando la aorta de ratones C57BL/6 se expuso a NETs de GBD, hubo una reducción en la vasorrelajación mediada por acetilcolina, lo cual fue secundario a la presencia de MMP9 [79], confirmando que la carga proteica de las NETs de GBD es tóxica para las células endoteliales. Por otra parte, las NETs son una fuente de DNA e histonas extracelulares que han demostrado ser citotóxicos para el endotelio [79]. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las NETs y GBD podrían tener un papel como parte de los mecanismos de daño endotelial en las MII y la producción de calcinosis. Acorde con nuestros resultados, recientemente se demostró que los neutrófilos rodean los depósitos de calcio en los tejidos de los pacientes con DMJ y que los cristales de calcio son inductores de NETs, lo que confirma la relación entre NETosis y calcinosis en la MII [80].

Otro mecanismo potencial de daño vascular promovido por LDG y NETs es el efecto interferogénico de LL-37. Encontramos que las NETs de GBD y neutrófilos convencionales son una fuente de LL-37, que se sabe que promueve la secreción de interferón tipo I por células dendríticas plasmocitoides [81]. LL-37 se expresa en los neutrófilos de la piel y los músculos de pacientes con polimiositis y dermatomiositis independientemente de la duración de la enfermedad y la terapia inmunosupresora y se correlaciona con los niveles de CPK [81], similar a nuestros hallazgos. Nuestro estudio plantea a las NETs como una potencial fuente de LL-37 extracelular lo que puede contribuir a la activación de la vía del IFN tipo I en MII.

En cuanto al perfil de autoanticuerpos, encontramos que los GBD se encuentran aumentados en pacientes con DM con anticuerpos anti MDA5. Dichos pacientes presentan una firma de IFN intensa, vasculopatía, con EPI severa, úlceras, pápulas palmares y manos de mecánico, con rarefacción capilar y estructuras túbulo-reticulares en células endoteliales de biopsias musculares [82]. Además, confirmando el efecto vasculopático de las NETs, encontramos aumento de las NETs circulantes en pacientes con anticuerpos anti PM-Scl75. En estos sujetos, la NETosis también podría tener un papel vasculopático, ya que presentan fenómeno de Raynaud y características similares a esclerosis sistémica [83]. Además, la combinación de un alto porcentaje de GBD CD10+ y NETs se relacionó con la presencia de calcinosis y úlceras cutáneas, lo que confirma su papel como marcadores de vasculopatía en el contexto de las MII.

Por otra parte, las NETs fueron más altas en pacientes con títulos elevados de anticuerpos antinucleares, lo que coincide con los datos de van der Linden, *et al*, quienes demostraron que en pacientes con LEG, los títulos altos de anticuerpos antinucleares se asocian con un aumento de NETs circulantes [84].

Finalmente, nuestro estudio es el primero en describir la expresión de las E3 ligasas de ubiquitina TRIM63 y Atrogin-1 en CMNs y músculo de pacientes con MII, lo que constituye a este grupo de enfermedades como un modelo de atrofia inducida por inflamación.

La inflamación sistémica presente en las MII, incluyendo las alteraciones en neutrófilos y monocitos previamente descritas, pueden contribuir a la expresión de dichas ligasas de ubiquitina. La expresión de Atrogin-1 se encuentra regulada principalmente por el factor de transcripción FOXO [85], mientras que la de TRIM63 se induce por citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF- $\alpha$ , IL6, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  mediante NF- $\kappa$ B o STAT-1 [86]. En líneas celulares musculares (C2C12), el estímulo con IL-1 promueve la producción de Atrogin-1 y MuRF1 a través de NF- $\kappa$ B [87], por lo tanto, las citocinas clave en la inflamación muscular inducen la expresión de ambas E3 ligasas de ubiquitina.

Interesantemente, encontramos que los GBD correlacionaban con el daño muscular. La atrofia muscular puede estar relacionada con dicha población celular a través de la producción de especies reactivas de oxígeno durante la NETosis [88] ya que la síntesis de Atrogin-1 es promovida en células C2C12 por la p38 MAPK, ERK1/2 y JNK ante el estímulo con TNF- $\alpha$  y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las mismas células [89, 90]. Además, la atrofia muscular inducida por TNF, ocurre a través de NF- $\kappa$ B en presencia de ERO [90], lo cual sugiere la participación de esta subpoblación de neutrófilos mediada por su capacidad de inducir NETs y la expresión de Atrogin-1.

Dentro de los principales estímulos inflamatorios involucrados en atrofia muscular, se encuentran la estimulación de receptores de patrones moleculares asociados a daño y a patógenos, incluyendo receptores de ácidos nucleicos (RIG-1, y melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5)) y TLR9 en células dendríticas plasmocitoides [91]. La estimulación de RIG-1 y MDA5 conlleva la producción de citocinas pro-inflamatorias e IFN tipo I a través de IRF3, IRF7 y NF- $\kappa$ B [92]. Las proteínas inducidas por IFN- $\alpha$  como ISG-15 (Interferon stimulated gene) se han encontrado en miofibras atroficas [32] y los interferones tipo I han demostrado ser capaces de inhibir la diferenciación de fibras musculares de ratón en cultivos celulares [93].

Tanto IFN- $\alpha$  como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  son capaces de inducir la transcripción del gen de Atrogin-1 y TRIM63, esta última citocina a través de NF- $\kappa$ B y STAT-1 $\alpha$  [94]. La presencia de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , disminuyen la expresión de la cadena pesada de miosina IIa y del factor regulador muscular de diferenciación MyoD [94]. Nuestros datos enfatizan la capacidad de los IFN tipo I y II de inducir atrofia y de impedir la diferenciación de mioblastos a miocitos.

#### **X. Conclusiones.**

Los pacientes con MII tienen alteraciones cuantitativas y funcionales en componentes de la inmunidad innata como son monocitos y GBD, lo cual correlaciona con citocinas pro-inflamatorias y parámetros de actividad y daño. Los pacientes con MII tienen aumento en la expresión de las E3 ligasas de ubiquitina Atrogin-1 y TRIM63 en relación con proteínas relacionadas con IFN y la expresión de Atrogin-1 en CMNs es mayor en pacientes con atrofia clínicamente determinada, lo que la convierte en un potencial biomarcador de dicha complicación en MII.

#### **XI. Referencias.**

- 1 Milone M. Diagnosis and Management of Immune-Mediated Myopathies. *Mayo Clin Proc* 2017;92(5):826-37.
- 2 Miller F. W., Lamb J. A., Schmidt J., Nagaraju K. Risk factors and disease mechanisms in myositis. *Nat Rev Rheumatol* 2018;14(5):255-68.
- 3 Zong M., Bruton J. D., Grundtman C., et al. TLR4 as receptor for HMGB1 induced muscle dysfunction in myositis. *Ann Rheum Dis* 2013;72(8):1390-9.
- 4 Grundtman C Bruton J, Yamada T, Ostberg T, Pisetsky DS, Harris HE, Andersson U, Lundberg IE, Westerblad H. Effects of HMGB1 on in vitro responses of isolated muscle fibers and functional aspects in skeletal muscles of idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J* 2010;24(2):570-8.
- 5 Rayavarapu S Coley W, Kinder TB, Nagaraju K. Idiopathic inflammatory myopathies: pathogenic mechanisms of muscle weakness. *Skelet Muscle* 2013;3(1):13.
- 6 Tieu J., Lundberg I. E., Limaye V. Idiopathic inflammatory myositis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2016;30(1):149-68.
- 7 Malik A., Hayat G., Kalia J. S., Guzman M. A. Idiopathic Inflammatory Myopathies: Clinical Approach and Management. *Front Neurol* 2016;7:64.
- 8 Pestronk A. Acquired immune and inflammatory myopathies: pathologic classification. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23(6):595-604.
- 9 Ziegler-Heitbrock L. Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. *Front Immunol* 2015;6:423.
- 10 Nicholson L. B., Raveney B. J., Munder M. Monocyte dependent regulation of autoimmune inflammation. *Curr Mol Med* 2009;9(1):23-9.
- 11 Gordon S., Taylor P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5(12):953-64.
- 12 Jimenez-Dalmaroni M. J., Gerswhin M. E., Adamopoulos I. E. The critical role of toll-like receptors--From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmun Rev* 2016;15(1):1-8.
- 13 Jiang W., Gilkeson G. Sex Differences in monocytes and TLR4 associated immune responses; implications for systemic lupus erythematosus (SLE). *J Immunother Appl* 2014;1:1.
- 14 Wong K. L., Yeap W. H., Tai J. J., Ong S. M., Dang T. M., Wong S. C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 2012;53(1-3):41-57.

- 15 Anbazhagan K., Duroux-Richard I., Jorgensen C., Apparailly F. Transcriptomic network support distinct roles of classical and non-classical monocytes in human. *Int Rev Immunol* 2014;33(6):470-89.
- 16 Grip O., Bredberg A., Lindgren S., Henriksson G. Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(5):566-72.
- 17 Rossol M., Kraus S., Pierer M., Baerwald C., Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum* 2012;64(3):671-7.
- 18 Nguyen H. X., Lusic A. J., Tidball J. G. Null mutation of myeloperoxidase in mice prevents mechanical activation of neutrophil lysis of muscle cell membranes in vitro and in vivo. *J Physiol* 2005;565(Pt 2):403-13.
- 19 Lee K. H., Kronbichler A., Park D. D., et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun Rev* 2017;16(11):1160-73.
- 20 Marini O., Costa S., Bevilacqua D., et al. Mature CD10(+) and immature CD10(-) neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* 2017;129(10):1343-56.
- 21 Rahman S., Sagar D., Hanna R. N., et al. Low-density granulocytes activate T cells and demonstrate a non-suppressive role in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2019.
- 22 Wigerblad G., Kaplan M. J. NETs spread ever wider in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2020;16(2):73-4.
- 23 Villanueva E., Yalavarthi S., Berthier C. C., et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2011;187(1):538-52.
- 24 Bertaglia E., Coletto L., Sandri M. Posttranslational modifications control FoxO3 activity during denervation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;302(3):C587-96.
- 25 Chacon-Cabrera A., Lund-Palau H., Gea J., Barreiro E. Time-Course of Muscle Mass Loss, Damage, and Proteolysis in Gastrocnemius following Unloading and Reloading: Implications in Chronic Diseases. *PLoS One* 2016;11(10):e0164951.
- 26 Li L., Dai T., Lv J., et al. Role of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene I in endogenous production of type I interferon in dermatomyositis. *J Neuroimmunol* 2015;285:161-8.
- 27 Cappelletti C, Baggi F, Zolezzi F, Biancolini D, Beretta O, Severa M, Coccia EM, Confalonieri P, Morandi L, Mora M, Mantegazza R, Bernasconi P. Type I interferon and Toll-like receptor expression characterizes inflammatory myopathies. *Neurology* 2011;76(24):2079-88.
- 28 Ventadour S, Attaix D. Mechanisms of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18(6):631-5.
- 29 Komander D., Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 2012;81:203-29.
- 30 Ebner P., Versteeg G. A., Ikeda F. Ubiquitin enzymes in the regulation of immune responses. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2017;52(4):425-60.
- 31 Rayavarapu S., Coley W., Van Der Meulen J. H., et al. Activation of the ubiquitin proteasome pathway in a mouse model of inflammatory myopathy: a potential therapeutic target. *Arthritis Rheum* 2013;65(12):3248-58.
- 32 Salajegheh M., Kong S. W., Pinkus J. L., et al. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) conjugates proteins in dermatomyositis muscle with perifascicular atrophy. *Ann Neurol* 2010;67(1):53-63.
- 33 Lee S. W. Regulation of Muscle Protein Degradation: Coordinated Control of Apoptotic and Ubiquitin-Proteasome Systems by Phosphatidylinositol 3 Kinase. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004;15(6):1537-45.
- 34 Clarke B. A., Drujan D., Willis M. S., et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* 2007;6(5):376-85.
- 35 Brandao M., Marinho A. Idiopathic inflammatory myopathies: definition and management of refractory disease. *Autoimmun Rev* 2011;10(11):720-4.
- 36 Rider L. G., Werth V. P., Huber A. M., et al. Measures of adult and juvenile dermatomyositis, polymyositis, and inclusion body myositis: Physician and Patient/Parent Global Activity, Manual Muscle Testing (MMT), Health Assessment Questionnaire (HAQ)/Childhood Health Assessment Questionnaire (C-HAQ), Childhood Myositis Assessment Scale (CMAS), Myositis Disease Activity Assessment Tool (MDAAT), Disease Activity Score (DAS), Short Form 36 (SF-36), Child Health Questionnaire (CHQ), physician global damage, Myositis Damage Index (MDI), Quantitative Muscle Testing (QMT), Myositis Functional Index-2 (FI-2), Myositis Activities Profile (MAP), Inclusion Body Myositis Functional Rating Scale (IBMFRS), Cutaneous Dermatomyositis Disease Area and Severity Index (CDASI), Cutaneous

- Assessment Tool (CAT), Dermatomyositis Skin Severity Index (DSSI), Skindex, and Dermatology Life Quality Index (DLQI). *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63 Suppl 11:S118-57.
- 37 Rider L. G., Lachenbruch P. A., Monroe J. B., et al. Damage extent and predictors in adult and juvenile dermatomyositis and polymyositis as determined with the myositis damage index. *Arthritis Rheum* 2009;60(11):3425-35.
- 38 Aggarwal R., Rider L. G., Ruperto N., et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for minimal, moderate, and major clinical response in adult dermatomyositis and polymyositis: An International Myositis Assessment and Clinical Studies Group/Paediatric Rheumatology International Trials Organisation Collaborative Initiative. *Ann Rheum Dis* 2017;76(5):792-801.
- 39 Bohan A., Peter J. B. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292(7):344-7.
- 40 Euwer R. L., Sontheimer R. D. Amyopathic dermatomyositis: a review. *J Invest Dermatol* 1993;100(1):124S-7S.
- 41 Remijsen Q., Vanden Berghe T., Wirawan E., et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* 2011;21(2):290-304.
- 42 Oddis C. V., Rider L. G., Reed A. M., et al. International consensus guidelines for trials of therapies in the idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 2005;52(9):2607-15.
- 43 Denny M. F., Yalavarthi S., Zhao W., et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol* 2010;184(6):3284-97.
- 44 Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116(16):e74-80.
- 45 Lood C., Blanco L. P., Purmalek M. M., et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med* 2016;22(2):146-53.
- 46 Carmona-Rivera C., Kaplan M. J. Induction and Quantification of NETosis. *Curr Protoc Immunol* 2016;115:14 41 1-14 41 14.
- 47 Coit P., Yalavarthi S., Ognenovski M., et al. Epigenome profiling reveals significant DNA demethylation of interferon signature genes in lupus neutrophils. *J Autoimmun* 2015;58:59-66.
- 48 Seto N., Torres-Ruiz J. J., Carmona-Rivera C., et al. Neutrophil dysregulation is pathogenic in idiopathic inflammatory myopathies. *JCI Insight* 2020;5(3).
- 49 Zhang S., Shu X., Tian X., Chen F., Lu X., Wang G. Enhanced formation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps in dermatomyositis and polymyositis: a potential contributor to interstitial lung disease complications. *Clin Exp Immunol* 2014;177(1):134-41.
- 50 Kaiser R., Tang L. F., Taylor K. E., et al. A polymorphism in TLR2 is associated with arterial thrombosis in a multiethnic population of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 2014;66(7):1882-7.
- 51 Gaur P., Myles A., Misra R., Aggarwal A. Intermediate monocytes are increased in enthesitis-related arthritis, a category of juvenile idiopathic arthritis. *Clinical & Experimental Immunology* 2017;187(2):234-41.
- 52 Gjelstrup M. C., Stilund M., Petersen T., Moller H. J., Petersen E. L., Christensen T. Subsets of activated monocytes and markers of inflammation in incipient and progressed multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol* 2018;96(2):160-74.
- 53 Zeng Q., Dong X., Ruan C., et al. CD14(+)CD16(++) monocytes are increased in patients with NMO and are selectively suppressed by glucocorticoids therapy. *J Neuroimmunol* 2016;300:1-8.
- 54 Mukherjee R., Kanti Barman P., Kumar Thatoi P., Tripathy R., Kumar Das B., Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep* 2015;5:13886.
- 55 O'brien E. C., Abdulahad W. H., Rutgers A., et al. Intermediate monocytes in ANCA vasculitis: increased surface expression of ANCA autoantigens and IL-1beta secretion in response to anti-MPO antibodies. *Sci Rep* 2015;5:11888.
- 56 Gomez D. C., Mehrad B. Eosinophilic pneumonia associated with pirfenidone therapy. *Eur Respir J* 2016;48(4):1240-2.
- 57 Eljaszewicz Andrzej, Kleina Katarzyna, Grubczak Kamil, et al. Elevated Numbers of Circulating Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs) and Intermediate CD14++CD16+ Monocytes in IgA Nephropathy. *Stem Cell Reviews and Reports* 2018;14(5):686-93.

- 58 Ren X., Mou W., Su C., et al. Increase in Peripheral Blood Intermediate Monocytes is Associated with the Development of Recent-Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children. *Int J Biol Sci* 2017;13(2):209-18.
- 59 Wypasek E., Padjas A., Szymanska M., Plens K., Siedlar M., Undas A. Non-classical and intermediate monocytes in patients following venous thromboembolism: Links with inflammation. *Adv Clin Exp Med* 2019;28(1):51-8.
- 60 Grosse G. M., Schulz-Schaeffer W. J., Teebken O. E., et al. Monocyte Subsets and Related Chemokines in Carotid Artery Stenosis and Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci* 2016;17(4):433.
- 61 Tsukamoto M., Seta N., Yoshimoto K., Suzuki K., Yamaoka K., Takeuchi T. CD14(bright)CD16+ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017;19(1):28.
- 62 Rogacev K. S., Zawada A. M., Hundsdorfer J., et al. Immunosuppression and monocyte subsets. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30(1):143-53.
- 63 Guła Z, Stec M, Rutkowska-Zapała M, Lenart M, Korkosz M, Gąsowski J, Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Czyż J, Siedlar M. The absolute number of circulating nonclassical (CD14+CD16++) monocytes negatively correlates with DAS28 and swollen joint count in patients with peripheral spondyloarthritis. *Pol Arch Intern Med* 2017;127(12):846-53.
- 64 Rana A. K., Li Y., Dang Q., Yang F. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *Int Immunopharmacol* 2018;65:348-59.
- 65 San Emeterio C. L., Olingy C. E., Chu Y., Botchwey E. A. Selective recruitment of non-classical monocytes promotes skeletal muscle repair. *Biomaterials* 2017;117:32-43.
- 66 Atehortua L., Rojas M., Vasquez G. M., Castano D. Endothelial Alterations in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis: Potential Effect of Monocyte Interaction. *Mediators Inflamm* 2017;2017:9680729.
- 67 Biswas S., Zimman A., Gao D., Byzova T. V., Podrez E. A. TLR2 Plays a Key Role in Platelet Hyperreactivity and Accelerated Thrombosis Associated With Hyperlipidemia. *Circ Res* 2017;121(8):951-62.
- 68 Ben D. F., Yu X. Y., Ji G. Y., et al. TLR4 mediates lung injury and inflammation in intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2012;174(2):326-33.
- 69 Iwahashi M., Yamamura M., Aita T., et al. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(5):1457-67.
- 70 Leonard J. P., Sherman M. L., Fisher G. L., et al. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 1997;90(7):2541-8.
- 71 Kim G. T., Cho M. L., Park Y. E., et al. Expression of TLR2, TLR4, and TLR9 in dermatomyositis and polymyositis. *Clin Rheumatol* 2010;29(3):273-9.
- 72 Yasin S. A., Schutz P. W., Deakin C. T., et al. Histological heterogeneity in a large clinical cohort of juvenile idiopathic inflammatory myopathy: analysis by myositis autoantibody and pathological features. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2019;45(5):495-512.
- 73 Blechyn den Lm Lawson MA, Tabarias H, Garlepp MJ, Sherman J, Raben N, Lawson CM. Myositis induced by naked DNA immunization with the gene for histidyl-tRNA synthetase. *Hum Gene Ther* 1997;8(12):1469-80.
- 74 Kaplan M. J. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7(12):691-9.
- 75 Perobelli S. M., Mercadante A. C., Galvani R. G., et al. G-CSF-Induced Suppressor IL-10+ Neutrophils Promote Regulatory T Cells That Inhibit Graft-Versus-Host Disease in a Long-Lasting and Specific Way. *J Immunol* 2016;197(9):3725-34.
- 76 Kegerreis B. J., Catalina M. D., Geraci N. S., Bachali P., Lipsky P. E., Grammer A. C. Genomic Identification of Low-Density Granulocytes and Analysis of Their Role in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 2019;202(11):3309-17.
- 77 Zhang S., Shen H., Shu X., Peng Q., Wang G. Abnormally increased low-density granulocytes in peripheral blood mononuclear cells are associated with interstitial lung disease in dermatomyositis. *Mod Rheumatol* 2017;27(1):122-9.
- 78 Peng Y., Zhang S., Zhao Y., Liu Y., Yan B. Neutrophil extracellular traps may contribute to interstitial lung disease associated with anti-MDA5 autoantibody positive dermatomyositis. *Clin Rheumatol* 2018;37(1):107-15.

- 79 Helmers S. B., Bruton M., Loell I., et al. Expression of interleukin-18 in muscle tissue of patients with polymyositis or dermatomyositis and effects of conventional immunosuppressive treatment. *Rheumatology (Oxford)* 2018;57(12):2149-57.
- 80 Duvvuri B., Pachman L. M., Morgan G., et al. Neutrophil Extracellular Traps in Tissue and Periphery in Juvenile Dermatomyositis. *Arthritis Rheumatol* 2019.
- 81 Lu X., Tang Q., Lindh M., et al. The host defense peptide LL-37 a possible inducer of the type I interferon system in patients with polymyositis and dermatomyositis. *J Autoimmun* 2017;78:46-56.
- 82 Kurtzman D. J. B., Vleugels R. A. Anti-melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) dermatomyositis: A concise review with an emphasis on distinctive clinical features. *J Am Acad Dermatol* 2018;78(4):776-85.
- 83 Damoiseaux J., Vulsteke J. B., Tseng C. W., et al. Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathies: Clinical associations and laboratory evaluation by mono- and multispecific immunoassays. *Autoimmun Rev* 2019.
- 84 Van Der Linden M., Van Den Hoogen L. L., Westerlaken G. H. A., et al. Neutrophil extracellular trap release is associated with antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus and anti-phospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2018;57(7):1228-34.
- 85 Kang S. H., Lee H. A., Kim M., Lee E., Sohn U. D., Kim I. Forkhead box O3 plays a role in skeletal muscle atrophy through expression of E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and atrogin-1 in Cushing's syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017;312(6):E495-E507.
- 86 Wu C. L., Cornwell E. W., Jackman R. W., Kandarian S. C. NF-kappaB but not FoxO sites in the MuRF1 promoter are required for transcriptional activation in disuse muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014;306(8):C762-7.
- 87 Li W., Moylan J. S., Chambers M. A., Smith J., Reid M. B. Interleukin-1 stimulates catabolism in C2C12 myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297(3):C706-14.
- 88 Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* 2013;210(7):1283-99.
- 89 Li Y. P., Chen Y., John J., et al. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J* 2005;19(3):362-70.
- 90 Li Yp Chen Y, Li AS, Reid MB. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285(4):C806-12.
- 91 Arshanapalli A., Shah M., Veerula V., Somani A. K. The role of type I interferons and other cytokines in dermatomyositis. *Cytokine* 2015;73(2):319-25.
- 92 Li X., Lu C., Stewart M., et al. Structural basis of double-stranded RNA recognition by the RIG-I like receptor MDA5. *Arch Biochem Biophys* 2009;488(1):23-33.
- 93 Franzi S., Salajegheh M., Nazareno R., Greenberg S. A. Type 1 interferons inhibit myotube formation independently of upregulation of interferon-stimulated gene 15. *PLoS One* 2013;8(6):e65362.
- 94 Pijet B., Pijet M., Litwiniuk A., Gajewska M., Pajak B., Orzechowski A. TNF- alpha and IFN-s-dependent muscle decay is linked to NF-kappaB- and STAT-1alpha-stimulated Atrogin1 and MuRF1 genes in C2C12 myotubes. *Mediators Inflamm* 2013;2013:171437.