



**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:

**EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA INFLAMACIÓN
EN LA FISIOPATOGENIA DEL LUPUS ERITEMATOSO CUTÁNEO**

Modalidad de Graduación:

TESIS

que para optar por el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS

Presenta:

DRA. SILVIA MÉNDEZ FLORES

Tutores:

DRA. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA

DRA. GABRIELA HERNÁNDEZ MOLINA

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN**

Ciudad de México, Enero 2020



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 DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

DRA. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA
TUTOR DE TESIS
DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

DRA. GABRIELA AURORA HERNÁNDEZ MOLINA
TUTOR DE TESIS
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

DR. JOAQUIN ZUÑIGA RAMOS
MIEMBRO DE COMITÉ TUTORIAL
DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO
VILLEGAS”

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

INDICE

I.	Resumen.....	1
II.	Antecedentes.....	4
III.	Justificación y Planteamiento del Problema.....	18
IV.	Hipótesis.....	19
V.	Objetivos.....	19
VI.	Metodología.....	21
	a. Aislamiento de ARN y análisis cuantitativos de PCR en tiempo real de micro-ARN.....	24
	b. Análisis de enriquecimiento de genes y vías objetivo.....	25
	c. Procedimiento de Doble-Tinción para determinar quimiocinas.....	26
	d. Inmunohistoquímica.....	28
	e. Procedimiento de Doble-Tinción para determinar las subpoblaciones celulares.....	29
	f. Citometría de Flujo.....	30
	g. Consideraciones Éticas.....	32
	h. Análisis estadístico.....	32
VII.	Resultados	
	a. Expresión de tisular de quimiocinas.....	33
	b. Correlación entre la expresión de quimiocinas y las subpoblaciones celulares circulantes y tisulares.....	41
	c. Determinación de niveles circulantes de mRNAs.....	43

d.	Correlación entre los niveles séricos de mRNAs y la puntuación de actividad CLASI.....	48
e.	Asociaciones de mRNAs y subpoblaciones de células circulantes y cutáneas.....	48
f.	Análisis de enriquecimiento de los mRNAs expresados diferencialmente en pacientes con LECS y LED.....	60
VIII.	Discusión.....	64
IX.	Conclusiones.....	74
X.	Referencias bibliograficas.....	75
XI.	Anexos	
a.	Anexo 1: CLASI (<i>Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index</i>).....	88
b.	Anexo 2: Correlaciones entre subpoblaciones tisulares y mRNAs circulantes.....	89
c.	Anexo 3. Correlación entre subpoblaciones celulares circulantes y mRNAs circulantes.....	90
XII.	Tablas	
a.	Tabla 1.1 Características Demográficas, Clínicas y de Laboratorio.....	34
b.	Tabla 1.2 Características Demográficas y Clínicas.....	44
c.	Tabla 2a. Niveles séricos de microRNAs en pacientes con Lupus Cutáneo y en controles.....	46

d. Tabla 2b. Expresión de microRNAs circulantes que fueron significativamente diferentes entre los pacientes con LEC y controles.....	47
e. Tabla 3. Modelos de Regresión Lineal Múltiple de pacientes con LECS.....	49
f. Tabla 4. Modelos de Regresión Lineal Múltiple de pacientes con LED.....	49

XIII. Figuras:

a. Figura 1.1.....	37
b. Figura 2.1.....	38
c. Figura 3.1.....	39
d. Figura 4.1.....	40
e. Figura 5.1.....	41
f. Figura 1.2.....	47
g. Figura 2.2.....	50
h. Figura 3.2.....	59
i. Figura 4.2.....	62
j. Figura 5.2.....	63

I. RESUMEN

-

Título: Evaluación de los mecanismos moleculares de la inflamación en la fisiopatogenia del Lupus Eritematoso Cutáneo.

Antecedentes: La fisiopatogenia del lupus eritematoso cutáneo (LEC) ha sido poco estudiada y, por lo tanto, son pocos los blancos terapéuticos. En su conjunto, el estudio de la expresión de quimiocinas y miRNAs, nos permitirán incrementar el conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en la fisiopatogenia del LEC.

Objetivos: Evaluar en tejido la expresión de quimiocinas y sus receptores, así como su correlación con las poblaciones celulares de linfocitos efectores tanto a nivel tisular como periférico. Determinar los niveles séricos de un panel seleccionado de miRNAs circulantes que podrían estar involucrados en la regulación de la respuesta inmune, la inflamación y la fibrosis en LEC.

Métodos: El presente es un estudio transversal, que incluyó 22 pacientes con LEC en su variedad subagudo (LECS) y 20 con variedad lupus discoide (LED), y 19 sujetos sanos. Mediante estudios de inmunohistoquímica en la piel se realizó la determinación de quimiocinas/receptores (CXCL-10/CXCR3, CCL2/CCR2, CCL17/CCR4, CCL20/CCR6, CCL27/CCR10, CXCL8/CXCR1, CXCL13/CXCR5), así como poblaciones de células T y células reguladoras (IL-22, CD4/IL-17A, CD4/IL-4, CD4/IFN- γ , CD123/IDO, CD25/Foxp3, y células CD20/IL-10). Mediante citometría de flujo se determinaron las subpoblaciones

de células circulantes (CD4+/CD161-/IL-22+, CD4+/CD161+/IL-17+, CD4+/CD25-/IL-4+, CD4+/CD25-/IFN- γ +, CD4+/CD25hi/Foxp3+, CD3+/CD19+/CD38hi/IL-10+ y CD123+/CD196+/IDO), y a nivel sérico mediante qPCR la determinación de una firma de miRNAs circulantes (miR-21-5p, miR-29a, miR-29b, miR23b, miR-31, miR-146a, miR-155, miR-150, miR-1246, miR-197, miR-485).

Resultados: En el tejido de pacientes con LEC observamos la participación de CXCL8, CXCL10, CCL2, CKR2A, CCL27, CCR10, CXCL13, CXCR5, CXCL8 y CCR6. La inmunorreactividad de CXCL10, CCL27, CXCL8 y CCR6 predominó en el grupo de pacientes con LED.

En el tejido la expresión de CXCL10, CXCR5 y CCL20 y los porcentajes de Th22, Th17, Th1 y CD123+/IDO+ (pDCregs) aumentaron en el LED versus LECS. Mientras que en circulación las células Th22, Th17, Th1, Bregs, pDCregs fueron mayores en LED versus LECS. En el tejido, se determinaron correlaciones positivas entre las células CXCR3+ y Th17; CCR2+ y Th1; y CCR10+ y pDCregs en pacientes LED y entre las células CXCL13+ y Bregs en pacientes LECS.

En la sangre periférica, se determinaron correlaciones positivas entre las células CXCR5+ y Th1; CCL17+ y Th22; y CCL17+ y Th17 en los pacientes con LED y entre las células CXCR5+ y Bregs; CCR2+ y Tregs; y CXCR1+ y Tregs en los pacientes LECS. Asimismo, se determinó una correlación

positiva entre el dolor y la expresión de CCL2 y CCR6 en los pacientes con LECS.

Mientras que en el suero, determinamos la regulación negativa de Los niveles de miR-150, miR-1246, miR-21, miR-23b y miR-146 en LECS versus individuos sanos. Los niveles de miR-150, miR-1246 y miR-21 estaba negativamente regulados en los pacientes con LED versus individuos sanos. Las células periféricas Th2 y Tregs se asociaron negativamente con miR-23b y Th1 con miR-1246 en LECS, mientras que las células pDCregs se asociaron positivamente con miR-150 en LED. En el tejido, las células Th2 y Bregs se asociaron positivamente con miR-21 y Th1 con miR-31 en LECS, mientras que las células Th2 se asociaron positivamente con miR-150 y las células Bregs con miR-1246 y miR-146a en LED.

En el LECS, los niveles más bajos de miR-150 se correlacionaron con puntuaciones CLASI más altas. El análisis de enriquecimiento de la vía KEGG reveló que las vías de regulación del ciclo celular, p53, TGF- β , hormona tiroidea y vías de señalización del cáncer se comparten con miR-21, miR-31, miR-23b, miR-146a, miR-1246 y miR-150.

Conclusiones: Realizamos un estudio de dos diferentes vías fisiopatogénicas en LEC. La correlación entre la expresión de quimiocinas / receptores y las subpoblaciones de células efectoras y reguladoras mostraron respuestas diferenciales entre las dos variedades de LEC, y encontramos una regulación

a la baja de miR-150, miR-1246 y miR-21 en ambas variedades de lupus cutáneo.

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. (1)

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 (2).

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 (3). A pesar de que las manifestaciones cutáneas pocas veces ponen en peligro la vida del paciente, sí contribuyen a la morbilidad en términos de bienestar personal y psicosocial, así como a la incapacidad profesional, conllevando a altos costos médicos y sociales y a ocupar el tercer lugar de las enfermedades dermatológicas con mayor impacto psicosocial. (4)

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-específico) 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 (5).

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, anomalías del pigmento, lesiones bulosas, telangiectasias periungueales y calcinosis cutis (6).

A su vez, las lesiones específicas se subdividen en tres categorías de acuerdo a sus características clínicas: LEC agudo (LECA), LEC subagudo (LECS) y LEC 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 tímido; 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 (7). 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 (8). 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 anomalías 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 proinflamatorias como inmunomoduladoras (9). En las lesiones del LEC se ha evidenciado que el infiltrado inflamatorio predominantemente está constituido por linfocitos T CD4⁺ así como células dendríticas (10).

Las citocinas son 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 (11); 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 (12). 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 el RNAm 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 RNAm para la IL-4 no se detectó en ninguna muestra. Mientras que 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 (13). Toro y cols., evaluaron la expresión génica y proteica de la IL-2, INF- γ , IL-4, TNF- α e IL-1 β y de los receptores correspondientes. Los resultados mostraron un incremento en los ARNm para la IL-2, el INF- γ y el TNF- α y un aumento del IL-2R, el INF- γ R y el TNF- α R en la superficie de las células de la dermis de pacientes con LED (14), así como de TGF- β [11]. El 47% de los pacientes evaluados presentaron sobreexpresión de al menos una citocina; siendo la IL-5 y el INF- γ las más frecuentemente elevadas.

Al respecto, realizamos un estudio sobre la participación de citocinas tanto proinflamatorias como anti-inflamatorias (IL-10, INF- γ , IL-4, IL-17 e IL-22) y poblaciones celulares (Tregs, Bregs y pDCregs) circulantes y en piel de pacientes con LEC. El hallazgo principal mostró un incremento estadísticamente significativo de las células Th17, Th22 y células pDCregs en los pacientes con LEC, predominantemente aquellos con LED (15).

Actualmente se pretende continuar en la misma línea de investigación con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares

involucrados en la fisiopatogenia del LEC, la participación de las quimiocinas y de los microRNAs.

Quimiocinas

Las lesiones cutáneas específicas del LEC se caracterizan por un importante infiltrado inflamatorio perianexial y perivascular. La quimioatracción de los linfocitos que forman los infiltrados celulares a nivel cutáneo se debe en gran medida a la participación de quimiocinas (16). La investigación de quimiocinas dentro de la fisiopatogenia de LEC es escasa.

Las quimiocinas son proteínas de 70 aminoácidos y un peso molecular entre 8 a 15 kD, todas son dímeros, excepto el PF-4 que es un tetrámero, no obstante, la mayoría actúa fisiológicamente como monómeros. Todas las quimiocinas son producidas como precursores inactivos, que se escinden intracelularmente mediante enzimas y son secretados en forma activa por diversas células. Estas proteínas ejercen sus efectos biológicos mediante la interacción con los receptores transmembrana unidos a proteínas G, induciendo la activación de la fosfolipasa C (PLC) generando segundos mensajeros (inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG)). El DAG activa la proteína cinasa C (PKC) y el IP3 estimula la liberación de calcio intracelular. Estos mecanismos promueven la cascada de señalización a través de las MAPKs generando respuestas tales como la quimiotaxis, la degranulación, la liberación de aniones de superóxido, los cambios en la avidéz de las moléculas de adhesión (integrinas), la metástasis, el reclutamiento celular, la

inflamación, la angiogénesis/angiostasis, la cicatrización, etc. Su síntesis es a menudo estimulada por citoquinas proinflamatorias (17).

Las quimiocinas presentan una serie de características estructurales comunes, tales como la presencia de cuatro residuos de cisteína en regiones cripticas y altamente conservadas, unidas entre sí por puentes disulfuro, excepto las γ -quimiocinas que presentan dos cisteínas y un solo puente disulfuro. Dependiendo del número y la secuencia de estas cisteínas en el dominio amino terminal, las quimiocinas se dividen en 4 subfamilias (dos mayores con numerosas proteínas y dos menores con una o dos proteínas cada una), la primera se denomina CXC o alfa, la segunda CC o beta; mientras que las otras dos menores son CX3C y la familia XC. La clasificación tiene un significado funcional, y las familias de quimiocinas se relacionan con sus respectivas familias de receptores, si bien esta relación no es uno a uno. (17-18)

- ❖ **α -quimiocinas o CXCL** (las dos cisteínas cercanas al N-terminal están separadas por un aminoácido simple), se puede dividir en dos grupos de acuerdo a la presencia de tres aminoácidos denominados ELR (ácido glutámico-leucina-arginina) entre el N-terminal y la primera cisteína. Esta secuencia corta de aminoácidos parece ser necesaria, aunque no suficiente, para aquellas quimiocinas que activan y estimulan los neutrófilos y se sugiere que es esencial para la unión y activación de sus receptores (CXCR1 y CXCR2). A su vez, este grupo se divide en dos:

Las **quimiocinas CXC que poseen ELR** son la IL-8, GRO (α , β , γ), ENA-78, GCP-2 y NAP-2; son potentes quimioatrayentes y activadoras de los neutrófilos, y además angiogénicas. Otras son CTAP-III y β -tromboglobulina, pero no tienen actividad quimioatrayente sobre los neutrófilos a pesar de la presencia de ELR (19).

Las **quimiocinas CXC no ELR** son BCA-1, PF-4, PBP, IP-10, MIG, I-TAC, SDF-1a y SDF-1b; activan otras células, específicamente linfocitos T y monocitos, y son además angiostáticas.

Las α -quimiocinas son expresadas por monocitos, macrófagos, queratinocitos, fibroblastos, hepatocitos, neutrófilos, eosinófilos, astrocitos, plaquetas, linfocitos T, B y NK, endotelio, células epiteliales y células de melanoma.

Las células blanco de las quimiocinas CXCL son los neutrófilos, fibroblastos, basófilos, condrocitos, linfocitos B, células del músculo liso, linfocitos T, endotelio, células NK, monocitos, queratinocitos, megacariocitos y células de melanoma (17,19).

CXCL10 y su receptor CXCR3

CXCL10 o proteína 10 inducible con interferón- γ (IP-10) ejerce sus funciones a través de la unión con su receptor CXCR-3 también conocido como receptor de IP-10 o receptor MIG. La unión de CXCL10/CXCR3 modula la movilización de Ca^{2+} y la quimiotaxis. CXCR-3 se encuentra expresado únicamente en

linfocitos T activados con IL-2 pero no se expresa en células B, monocitos o granulocitos. La CXCL10 se expresa en células T CD4 y CD8 y NKs y es un marcador de células Th1. La CXCL10 y su receptor CXCR3 parecen contribuir a la patogenia de muchas enfermedades autoinmunes órgano-específicas y sistémicas (19).

❖ **β -quimiocinas o CCL** (las dos cisteínas están adyacentes) esta subfamilia es la más numerosa; son proteínas especialmente quimioatrayentes de monocitos y linfocitos T, aunque también actúan sobre eosinófilos, basófilos, células dendríticas, linfocitos B, timocitos, NK, progenitores mieloides y megacariocitos.

Las fuentes celulares de las quimiocinas CCL son muy diversas, entre ellas tenemos: monocitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, fibroblastos, células NK, endoteliales, células epiteliales, mastocitos, hepatocitos, linfocitos T, basófilos, plaquetas y células epiteliales tímicas.

Dentro de sus efectos biológicos encontramos que son quimiotácticas para linfocitos T, monocitos, eosinófilos, basófilos, células NK y células dendríticas; inducen la activación del endotelio, los eosinófilos, basófilos y células NK; regulan la degranulación y liberación de enzimas por las células NK y T citotóxicas; modulan la apoptosis; controlan el crecimiento de las células hematopoyéticas; modulan la diferenciación de las células T hacia un fenotipo Th1 o Th2 y aumentan la producción de IgE e IgG4 (17).

RANTES es inducible por mitógenos o antígenos en una variedad de líneas de células T y linfocitos circulantes. *In vitro* es un potente quimioatrayente de monocitos como la MCP-1, pero es mucho menos efectivo para estimular la exocitosis. Atrae también linfocitos T CD45RO⁺, CD4⁺, NK, eosinófilos, y es el más potente quimioatrayente para células CD8⁺; también induce la liberación de histamina (20).

La quimiocina DC-CK1 (quimiocina 1 de las células dendríticas) atrae selectivamente a los linfocitos T CD45RA⁺ y contribuye de esta manera a la inducción de la respuesta inmune primaria (17).

MCP-1 o CCL2 y su receptor CCR2 o CKR2

CCL2 o MCP-1 induce la expresión de las integrinas requeridas para la quimiotaxis; tiene acción sobre los monocitos, linfocitos T de memoria, basófilos y células NK; induce la liberación de gránulos por las células NK y los linfocitos T CD8⁺; es un potente inductor de la liberación de histamina por los basófilos y no atrae eosinófilos, en comparación con MCP-2 y 3. CCL2 y su receptor CCR2 han sido implicados en las patologías relacionadas a la permeabilidad vascular y la atracción de células inmunes durante la metástasis, desórdenes neurológicos, enfermedades autoinmunes, obesidad y aterosclerosis (21).

La familia de receptores de las quimiocinas C-C incluyen a CKR-1, CKR-2A, CKR-2B, CKR-3, CKR-4, CKR-5, CKR-6, CKR-7, CKR-8, CKR-9, CKR-10 y el

grupo de antígenos Duffy. Su papel fisiológico principal es la quimiotaxis de células T y células fagocíticas a los focos inflamatorios (19).

CCL17, TARC, dendrokina o ABCD2 y su receptor CCR4, CD194, CKR4 o CMKBR4

CCL17 es expresada en el timo y bazo su receptor es la quimiocina CCR4, es expresada predominantemente por células Th2, linfocitos cutáneos positivos a receptores de “regreso a casa”, células de leucemias/linfomas cutáneos y células reguladoras. CCL17 es una quimiocina importante en el reconocimiento de la vasculatura de la piel y de las células T circulantes. CCL17 carece de actividad supresora contra las subpoblaciones de células progenitoras mieloides (22).

Sin embargo, la participación de las quimiocinas en CLE apenas se ha evaluado y se dirige principalmente al estudio de la respuesta Th1. Por ejemplo, se ha descrito una mayor expresión de ARNm de CXCL9 y CXCL10 en pacientes con lupus discoide, lupus subcutáneo y lupus tumidus (23), mientras que, en otro estudio, los pacientes con lesiones cutáneas activas generalizadas tuvieron una expresión significativamente mayor de CCR5 en células mononucleares de sangre periférica, mientras que la expresión de CCR3 disminuyó en comparación con los controles sanos (24).

En el presente estudio se explorará la participación de algunas quimiocinas y sus receptores (CXCL10/CXCR3, CCL2/CKR2, CCL17/CCR4,

CCL20/CCR6, CCL27/CCR10, CXCL8/CXCR1, y CXCL13/CXCR5) las cuales se han asociado previamente a algunas enfermedades inflamatorias de piel.

Micro-RNAs

En los últimos años se ha demostrado además de los factores genéticos, las modificaciones epigenéticas aberrantes juegan un papel importante en la patogénesis del LEG, tal es el caso de los microRNAs (miRNAs, miR).

Los miRNAs son un grupo de moléculas de RNA pequeños no codificantes de 20-25 nucleótidos de longitud que por complementariedad de secuencias regulan genes blanco inhibiendo su expresión genética. A la fecha, en el genoma humano se conocen cerca de dos mil secuencias de miRNAs que regulan la expresión de aproximadamente entre el 60% del genoma en todos los tipos celulares y se estima que pueden regular hasta el 90% del total de los genes codificantes para proteínas. La mayoría de los miRNAs tienen su sitio blanco en la región 3' UTR (*untranslated region*) sobre del mRNA y en función de la complementariedad de secuencias se puede definir el mecanismo de acción 1) alta complementariedad, que provoca degradación del mRNA, y 2) baja complementariedad, que induce inhibición de la traducción o provoca la desadenilación del mRNA. Mediante la modulación de la expresión de los transcritos blanco, los miRNAs interfieren en procesos celulares vitales como proliferación, diferenciación, apoptosis y metabolismo (25).

Publicaciones recientes proveen evidencia que un gran número de miRNAs

están involucrados en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, estudios han demostrado la expresión selectiva del miR-181a en el timo y miR-223 en medula ósea, indicando un papel importante en la diferenciación de células madre hematopoyéticas pluripotenciales. Otros reportes han identificado al miR-150 como factor clave en la diferenciación de células T y B, mientras que el clúster el miR-17-92 como precursor de células mieloides. Perfiles de expresión de miRNAs realizados mediante microarreglos y secuenciación masiva, han identificado una sobreexpresión del miR-16 en células y tejidos involucrados en procesos inflamatorios, como monocitos, neutrófilos, células B y células T. Más aun, estos perfiles de expresión en otros padecimientos, han demostrado ser excelentes biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en diversas patologías como diabetes, desórdenes metabólicos, enfermedades neurodegenerativas y muchos tipos de cáncer (26).

En modelos de enfermedades autoinmunes, se ha reportado la intervención de varios miRNAs, incluyendo miR-146a, el miR-326, miRNA 23b, miR-126, miR-142-3p/5p, miR-182, miR-150, y miR-124a, y cómo éstos podrían modular la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, como el LEG, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple. Dentro de ellos, el miR-155, es uno de los miRNAs más importantes en la función del sistema inmune. Se expresa en una variedad de tipos de células inmunes, incluyendo células B, células T, macrófagos, células dendríticas y poblaciones celulares progenitoras, por lo que desempeña un papel importante en la hematopoyesis. La expresión de

miR-155 es regulada a la alta por una variedad de estímulos inmunológicos, tales como la exposición al antígeno, ligandos de TLR, y citocinas inflamatorias (27-29)

En el LEG se ha detectado la expresión de miRNAs en el plasma (30), suero (31), orina y células mononucleares periféricas (PBMC) (32). Diversos patrones de miRNA se han asociado con una determinada característica, como la afección renal (miR-146a), inicio en la infancia (miR-516a-3p, miR-629, miR-525-5p), actividad general de la enfermedad (miR-21, miR-146a) (31-33), y recientemente en LED (miR-31 y miR-485-3p) (34). De hecho, un estudio sugirió a miR-29b como un posible biomarcador de diagnóstico de LEG [área bajo la curva de 0,75 (IC del 95%: 0,64 a 0,86)] (35).

Por otro lado, la investigación centrada en comprender el papel de los miRNA en la regulación de las vías de señalización puede conducir al desarrollo de nuevos biomarcadores y un nuevo enfoque terapéutico. En este sentido, el miR-29b circulante también se propuso como un biomarcador para estimar la actividad del lupus, ya que se correlacionó positivamente con la puntuación SLEDAI y el título anti-DNAbs, e inversamente con el nivel de C3 del complemento y la respuesta clínica después del tratamiento (35).

Por lo tanto, nuestro objetivo principal fue evaluar los niveles circulantes de un panel seleccionado de miRNAs en función de su posible participación en la regulación de la respuesta inmune, la inflamación y la fibrosis entre pacientes con LEC. Específicamente, evaluamos los siguientes miRNA: familia miR-29 que regula la polarización de las células T (36); miR-150 involucrado en la

diferenciación de las células B y Th17, y la señalización de TGF- β (37); miR-23b relacionado con IL-17, TNF- α y expresión de IL-1 β (38); miR-1246 que está asociado con la activación de células B (39); miR-21 que se ha relacionado con diferenciación Th2 y Th17, así como la expresión de Foxp3+ (40); miR-31 que regula las células Treg, la activación de NF-kB y el proceso de fibrosis (41); miR-146 que parece regular negativamente las vías de señalización proinflamatorias a través de NF-kB y TLR / MyD88 (42-43); miR-155 que contribuye a la diferenciación Th1 y Th17 (44); miR-485 que participa en la diferenciación Th2 (33) y finalmente, miR-197 que intervienen en la respuesta Th22 (45).

III. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

=

A pesar de que las manifestaciones cutáneas pocas veces ponen en peligro la vida del paciente, sí contribuyen a la morbilidad en términos de bienestar personal y psicosocial, así como a la incapacidad profesional, conllevando a altos costos médicos y sociales y a ocupar el tercer lugar de las enfermedades dermatológicas con mayor impacto psicosocial. Su fisiopatogenia ha sido poco estudiada y, por lo tanto, son pocos los blancos terapéuticos.

En su conjunto, el estudio de la expresión de quimiocinas, y el estudio de miRNAs, nos permitirán incrementar el conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en la fisiopatogenia del Lupus Eritematoso Cutáneo lo cual se reflejara en el desarrollo de mejores métodos diagnósticos,

pronósticos y de evaluación de eficacia terapéutica basados en la expresión de biomarcadores, así como para el diseño de estrategias terapéuticas más específicas y efectivas.

IV. HIPÓTESIS:

=

- Predominará la expresión tisular de las quimiocinas CXCL8/CXCR1, CXCL10/CXCR3, CCL2/CKR2, CXCL13/CXCR5, CCL17/CCR4, CCL27/CCR10 y CCL20/CCR6 en pacientes con manifestaciones específicas de LEC (variedades LECS y LED) en comparación con pacientes con LEG, pero sin lupus cutáneo (LEG sin LEC) y con controles sanos.
- Existe una firma de microRNAs circulantes (miR-21-5p, miR-29a, miR-29b, miR23b, miR-31, miR-146a, miR-155, miR-150, miR-1246, miR-197, miR-485) que permitirá distinguir a los pacientes con LEC activo (en sus variedades LECS y LED) de los controles sanos.

V. OBJETIVOS:

=

- Determinar la expresión de quimiocinas y sus receptores CXCL8/CXCR1, CXCL10/CXCR3, CCL2/CKR2, CXCL13/CXCR5, CCL17/CCR4, CCL27/CCR10 y CCL20/CCR6 en biopsias de piel de pacientes con manifestaciones cutáneas específicas de LECS y LED y compararlas con su expresión en piel de pacientes con LEG sin in LEC

y en piel de controles sanos.

- Caracterizar la firma de miRNAs en suero implicada en la regulación postranscripcional (miR-21-5p, miR-29a, miR-29b, miR23b, miR-31, miR-146a, miR-155, miR-150, miR-1246, miR-197, miR-485) asociados a la presencia de manifestaciones cutáneas específicas de LED y LECS, en comparación con controles sanos.
- Cuantificar la expresión mediante inmunohistoquímica en biopsias de piel de pacientes con manifestaciones específicas de LED y LECS activo de las siguientes subpoblaciones celulares: CD4/IL-4 (Th2), CD4/IL-17 (Th17), CD4/IL-22 (Th22), CD4/INF- γ (Th1), CD20/IL-10 (Bregs), CD25/Foxp3 (Tregs) y CD123/IDO (dendríticas plasmacitoides reguladoras), y correlacionarlas con la expresión de quimiocinas y sus receptores (CXCL8/CXCR1, CXCL10/CXCR3, CCL2/CKR2, CXCL13/CXCR5, CCL17/CCR4, CCL27/CCR10 y CCL20/CCR6).
- Determinar los niveles circulantes de las subpoblaciones celulares circulantes: CD4+/CD25+/IL-4+, CD4+/CD161+/IL-17+, CD4+/CD161+/IL-22+, CD4+/CD25+/INF- γ +, CD123hi/CD196+/IDO+ (dendríticas plasmacitoides reguladoras), CD19+/CD38+/IL-10+ (Bregs) y CD4+/CD25+/Foxp3+ (Tregs) en pacientes con manifestaciones cutáneas específicas de LED y LECS; y correlacionarlos con la expresión sérica de miRNAs (miR-21-5p, miR-29a, miR-29b, miR23b, miR-31, miR-146a, miR-155, miR-150, miR-1246, miR-197, miR-485).

VI. METODOLOGÍA

-

Se trata de un estudio transversal y comparativo.

Cálculo de tamaño de la muestra: no existen estudios sobre la determinación de miRNAs en pacientes con Lupus Cutáneo.

Por lo cual el cálculo del tamaño de muestra se realizó en base a estudios de miRNAs de sujetos con LEG y nefropatía.

El cálculo de tamaño de la muestra se realizó con fórmula de comparación de medias (promedios).

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

Con la cual se obtuvo un tamaño de muestra de 18 pacientes y 18 controles.

Ya que se incluirán subtipos de LEC (LED y LECSA) se reclutarán 18 pacientes de cada uno de ellos, con la intención de poder analizar por subgrupos.

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 el 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 de una neoplasia de órgano sólido u 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)

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.

Las biopsias se obtuvieron previo consentimiento informado 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 para determinar expresión de quimiocinas. Se obtuvo, previo consentimiento informado una muestra de 20ml sangre periférica para realizar determinación de miRNAs en sangre.

Aislamiento de ARN y análisis cuantitativos de PCR en tiempo real de micro-ARN.

Se extrajo el RNA total con TRIzol (Invitrogen) a partir de 250 μ L de suero. Brevemente, se utilizaron 750 μ l de Trizol LS, incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Después se adicionaron 200 μ L de cloroformo; se centrifugaron a 12000 xg a 4 °C para separar las fases acuosa y orgánica. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo. Después de precipitar con 2-propanol y unos dos lavados con etanol, el RNA obtenido se resuspendió en 30 μ l de H₂O. La concentración y la calidad del RNA total se midieron mediante un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Waltham, Mass). Para cuantificar los miRNAs, se sintetizó el ADNc usando el kit de síntesis de primera cadena miRNA Mir-X (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN complementario (ADNc) se amplificó por PCR en tiempo real con un método fluorescente basado en verde SYBR utilizando la mezcla maestra Maxima SYBR Green / ROX qPCR (2X) (Thermo Scientific). U6 se utilizó como control endógeno para normalizar los valores de expresión. Elegimos el siguiente panel de miRNAs, por su efecto reportado en la literatura en las diferentes células reguladoras estudiadas aquí. Las secuencias de primers utilizadas para la PCR en tiempo real fueron las siguientes:

hsa-miR-21-5p, 5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3';

hsa-miR-29a,5'-TAGCACCATCTGAAATCGGTTA-3';

hsa-miR-29b, 5'-TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT-3';

hsa-miR23b, 5'-TGGGTTCCCTGGCATGCTGATTT-3';
hsa-miR-31,5'-AGGCAAGATGCTGGCATAGCT-3';
hsa-miR-146a, 5'-TGAGAACTGAATTCCATGGGTT-3';
hsa-miR-155,5'-TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT-3';
hsa-miR-150,5'-TCTCCCAACCCTTGTACCAGTG-3';
hsa-miR-1246,5'-AATGGATTTTTGGAGCAGG-3';
hsa-miR-197-3p,5'TTCACCACCTTCTCCACCCAGC-3';
hsa-miR-485-p,5'AGAGGCTGGCCGTGATGAATTC-3';
U6 *Forward*, 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3' y
U6 *Reversa*: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'.

Los ensayos de qRT-PCR se realizaron con PCR en tiempo real (Life Technologies, Foster City, CA). Las reacciones se llevaron a cabo con una incubación de 10 minutos a 95° seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y a 60°C durante 1 minuto. Todas las reacciones se realizaron por triplicado, y se calcularon el ciclo umbral promedio y los valores SD. Los niveles de las transcripciones se calcularon en función del ciclo umbral (Ct) utilizando el método delta-delta Ct que mide el pariente de un RNA objetivo entre dos muestras comparándolo con un RNA de control de normalización (U6).

Análisis de enriquecimiento de genes y vías objetivo.

Determinamos los objetivos genéticos de miRNAs identificados utilizando DIANA-TarBase v8 (<http://www.microrna.gr/tarbase>), que es una base de datos que contiene interacciones de miRNA-objetivo validadas

experimentalmente. Utilizamos DIANA-miRPath v3.0 (<http://www.microna.gr/miRPathv3>) y la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas (KEGG) de Kioto para la identificación de las redes y el enriquecimiento de las rutas de los genes objetivo de los miRNA seleccionados. Las vías enriquecidas que muestran significación estadística ($P \leq 0.05$) fueron sometidas a análisis moleculares adicionales y construcción de redes de interactomas. Las redes de interactomas se construyeron para conectar miRNAs a sus supuestos genes diana (o a vías de enriquecimiento) dentro de las vías enriquecidas seleccionadas; las redes resultantes se exportaron a Cytoscape v3.1.0 (<http://cytoscape.org/index.php>) para su visualización.

Procedimiento de Doble-Tinción para determinar quimiocinas:

Para determinar las subpoblaciones de células CXCL8⁺/CXCR1⁺, CXCL10⁺/CXCR3⁺, CCL2⁺/CKR2⁺, CXCL13⁺/CXCR5⁺, CCL17⁺/CCR4⁺, CCL27⁺/CCR10⁺ y CCL20⁺/CCR6⁺, se llevó a cabo una detección simultánea. Se utilizó un 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'-diaminobenzidine (DAB) y el segundo antígeno es visualizado utilizando fosfatasa alcalina (AP)/Permanent Red. Brevemente, se realiza una incubación de las muestras con 200 µl de bloqueadores endógenos de

enzimas 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 µl de suero normal como control negativo o con los anticuerpos policlonales primarios de ratón anti-CXCL8; anti-CXCL10; anti-CCL2; anti-CXCL13; anti-CCL27 o anti-CCL20 IgG₁ (Santa Cruz Biotechnology) a 10 µg/ml por 15 min, a temperatura ambiente. Las muestras son incubadas con 200 µl de polímero/HRP por 10 min. La reacción se visualiza con 200 µl de DAB durante 5-15 min. Posteriormente los tejidos se incuban con 200 µl inhibidor de AP por 3 min y luego se incuban con un suero normal como control negativo o con el segundo anticuerpo policlonal de conejo anti- CXCR1; anti-CXCR3; anti-CKR2; anti- CXCR5; anti-CCR10 o anti-CCR6 (Santa Cruz Biotecnología) a una concentración de 10 µg/ml, durante 15 min a temperatura ambiente. Después los tejidos se incuban con 200 µl del LINK durante 10 min. Finalmente, los tejidos se incuban con 200 µl de polímero AP durante 10 min. La reacción se visualiza con 200 µl 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 células CXCL8⁺/CXCR1⁺, CXCL10⁺/CXCR3⁺, CCL2⁺/CKR2⁺, CXCL13⁺/CXCR5⁺, CCL17⁺/CCR4⁺, CCL27⁺/CCR10⁺ y CCL20⁺/CCR6⁺, 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 ±

error estándar y la mediana del porcentaje de células inmunorreactivas empleando el programa Image Pro Plus versión 5 · 1 · 1.

Inmunohistoquímica:

A fin de identificar las células que expresaban 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.

Procedimiento de Doble-Tinción para determinar las subpoblaciones celulares:

Para determinar la subpoblaciones 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. 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'-diaminobenzidine (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 endógenos de enzimas 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 µg/ml, durante 15 min a temperatura ambiente. Después los tejidos se incubaron con 200 µl del LINK durante 10 min. Finalmente, los tejidos se incubaron con 200 µl de polímero AP durante 10 min. La reacción se visualizó con 200 µl de cromógeno Permanent Red durante 5-20 min. Los tejidos fueron contrateñidos 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 ± error estándar y la mediana del porcentaje de células inmunorreactivas empleando el programa Image Pro Plus versión 5 · 1 · 1.

Citometría de Flujo:

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-γ⁺), células Treg (CD3⁺/CD4⁺/CD25^{hi}/Foxp3⁺), células

Breg (CD19⁺/CD24^{hi}/CD38^{hi}/IL-10⁺) y pDCs (CD123^{hi}/CD196⁺/IDO⁺); las CMNs fueron incubadas con 5 µl 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 µl de solución cytofix/cytoperm (BD Biosciences) a 4°C por 30 min. La tinción intracelular se llevó a cabo mediante la incubación con 5 µl 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.). 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-γ⁺, Foxp3⁺, IL-10⁺ o IDO⁺ en cada ventana electrónica.

Como control de isotipo se empleó una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón de tipo IgG₁-k-FITC/IgG₁-PE/CD45-PeCy5 (BD Tritest™, BD Biosciences). Además, se realizó un control de autofluorescencia y los respectivos controles FMO (fluorescence minus one).

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.

Análisis estadístico.

Se realizó inicialmente estadística descriptiva, las variables continuas con distribución normal se expresarán como media y desviación estándar. En caso contrario se expresaron como medianas y mínimos y máximos o percentiles (5/95). La distribución normal se confirmó con la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las variables categóricas se expresaron como porcentajes, y se compararon mediante la prueba de Chi-2 o la prueba exacta de Fisher. Utilizamos la prueba U de Mann-Whitney para comparar dos medianas. Análisis de varianza unidireccional en los rangos Kruskal-Wallis, si la prueba de Kruskal-Wallis fue significativa, se realizó un análisis post-hoc (prueba de Dunn) para todos los procedimientos de comparación múltiple por pares. La expresión relativa de miRNAs, se reportó como medianas y rangos (percentiles 5/95). Informamos correlaciones no paramétricas utilizando coeficientes de Spearman entre la expresión serológica relativa de miRNAs y el puntaje CLASI. Una fuerte correlación se definió como un coeficiente de Spearman entre ± 0.50 y ± 1 , una correlación media entre ± 0.30 y ± 0.49 , y una correlación débil por debajo de 0.29. También realizamos un análisis de regresión lineal múltiple para evaluar la posible asociación de los miRNA

significativos y las subpoblaciones de células periféricas y cutáneas entre las variedades CLE.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron a 2 colas; Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Se utilizó el software SPSS (v. 21.0) y GraphPad Prism (v. 5) para el análisis estadístico.

VII. RESULTADOS:

=

VII.1. EXPRESIÓN DE TISULAR DE QUIMIOCINAS

Se incluyeron 18 pacientes con lupus cutáneo: 9 con LED y 9 con LECS, los controles fueron: 5 pacientes con LEG sin lesiones cutáneas (LEG sin LEC) y 10 controles sanos. Los datos demográficos, de laboratorio y clínicos de los pacientes y controles se muestran en la Tabla 1.1. Los pacientes con LECS tuvieron mayor puntuación de actividad evaluada mediante el CLASI ($p = 0.06$) así como mayor puntuación de Mex-SLEDAI ($p = 0.02$) en comparación con el resto de los grupos.

Tabla 1.1 Características Demográficas, Clínicas y de Laboratorio

	Sanos (n=10)	LEG sin actividad cutánea(n=5)	LED (n=9)	LECS (n=9)
Datos Demográficos				
Edad (años)				
Promedio ± DS	40.0 ± 15.6	44.8 ± 16.4	30.9 ± 9.7	35.3 ± 13.1
Mediana	42.0	44.0	29.0	34.0
Intervalo	21 - 62	28 - 70	20 - 47	18 - 56
Sexo (Mujer %)	90.0	80.0	100.0	88.9
Duración LEG (años)				
Promedio ± DS	NA	13.8 ± 6.8	7.7 ± 5.0	9.0 ± 8.5
Mediana		11.0	9.0	5.0
Intervalo		8 - 25	1 - 15	2 - 25
Variables de Laboratorio				
Anti-dsDNA (UI/ml)				
Promedio ± DS	NA	205.1 ± 119.6	237.1 ± 358.0	228.0 ± 324.5
Mediana		238.9	96.7	94.7
Intervalo		12 - 326	4 - 1055	7 - 957
C3 (UI/ml)				
Promedio ± DS	NA	95.2 ± 28.2	77.1 ± 23.9	76.7 ± 31.1
Mediana		86.0	75.4	74.0
Intervalo		69 - 139	45 - 111	42 - 127
C4 (UI/ml)				
Promedio ± DS	NA	13.4 ± 7.9	11.0 ± 4.4	15.2 ± 15.5
Mediana		8.0	9.8	8.0
Intervalo		7 - 23	7 - 19	6 - 54
VSG (mmHg)				
Promedio ± DS	NA	29.3 ± 27.8	32.5 ± 18.3	33.6 ± 19.4
Mediana		22.5	25.0	36.0
Intervalo		4 - 68	6 - 70	6 - 62
Variables clínicas				
CLASI Actividad				
Promedio ± DS	NA	NA	15.8 ± 6.8	21.9 ± 6.4
Mediana			13.0	23.0
Intervalo			8 - 29	14 - 35
Prednisona (mg/día)				
Promedio ± DS	NA	27.5	12.8 ± 9	25.28 ± 15
Mediana		27.5	11.25	30
Intervalo		5-50	5-30	5-50
Prednisona (%)	NA	40	88	100
Antimaláricos (%)	NA	40	44	44
FARME (%)	NA	60	89	44
Ciclofosfamida (%)	NA	20	11	11

Promedio ± DS (desviación estándar); NA: no aplica; FARME: fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad; LED: Lupus cutáneo discoide, LECS: Lupus cutáneo subagudo.

La expresión de CXCL10 aumentó en todos los grupos de pacientes con lupus (con o sin LEC) en comparación con los donantes sanos, y se encontró un mayor número de células inmunorreactivas en el tejido de pacientes con LED en comparación con LECS y con las muestras de los pacientes con LEG sin LEC (Figura 1.1, Figura 2.1 A y B). Por el contrario, la expresión de su receptor CXCR3 fue notablemente mayor en controles sanos en comparación al resto de los grupos.

El tejido de todos los pacientes con lupus (con o sin LEC) tuvo una mayor expresión de CCL2 en comparación con los controles sanos. En la misma línea, la expresión de CKR2A estaba prácticamente ausente en controles sanos. No encontramos ninguna diferencia al comparar LED versus el subgrupo de LECS (Figura 2.1 C y D).

Mientras tanto, el número de células inmunorreactivas de CCL27 fue mayor en la piel de pacientes con LED y LECS frente a controles sanos, así como en pacientes con LEG sin LEC. Sin embargo, no hubo diferencias cuando comparamos el grupo LEG sin afectación de la piel en comparación con controles sanos. Además, el número de células que expresaron CCR10 aumentó en el grupo de lupus sin LEC, y en el grupo LED en comparación con los controles sanos (Figura 3.1 A y B).

Los tejidos de pacientes con LEG sin LEC mostraron una mayor proporción de células inmunorreactivas de CXCL13 que los subgrupos de LED y LECS. Esta diferencia también se observó en controles sanos en comparación con la piel LED y LECS. En contraste, se observó una expresión notablemente más alta de su receptor CXCR5 entre el grupo LED en comparación con los

controles sanos y el grupo LECS (Figura 3.1 C y D).

También encontramos una mayor expresión de CXCL8 en los tres grupos de LEG (con LED, LECS y LEG sin LEC) en comparación con controles sanos; siendo la máxima expresión en el grupo de pacientes con LED. No hubo diferencias significativas en la expresión de CXCR1 entre los grupos (Figura 4.1 A y B).

Estudiamos CCL17 y no observamos ninguna diferencia entre todos los grupos, sin embargo, se encontró una menor inmunorreactividad de CCR4 en los grupos LED y LECS en comparación con el grupo de LEG sin LEC y controles sanos (Figura 4.1 C y D). Finalmente, la inmunoreactividad de CCL20 fue mayor en el grupo de pacientes con LEG sin LEC, en comparación a controles sanos y en pacientes con LED; mientras que CCR6 se expresó principalmente en el subconjunto LED y LECS cuando se comparó con controles sanos y con el grupo de LEG sin afectación cutánea, siendo esta expresión mayor en el grupo LED (Figura 5.1 A y B). La Figura 5.1 C muestra un resumen de nuestros resultados.

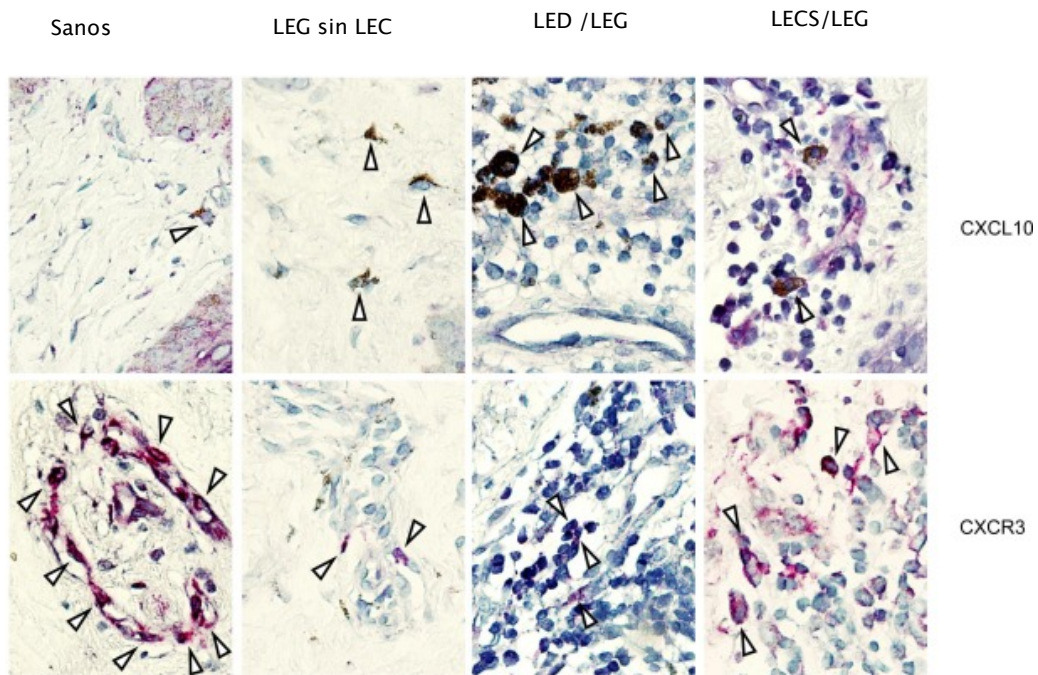


Figura 1.1. Inmunoreactividad de CXCL10 y CXCR3. Fotomicrografía representativa de un donador sano, LEG sin LEC (lupus eritematoso sistémico sin afectación de la piel), LEG/LED (lupus eritematoso discoide) y LEG/LECS (lupus cutáneo subagudo) teñidos por la técnica H&E. Las flechas representan células inmunorreactivas.

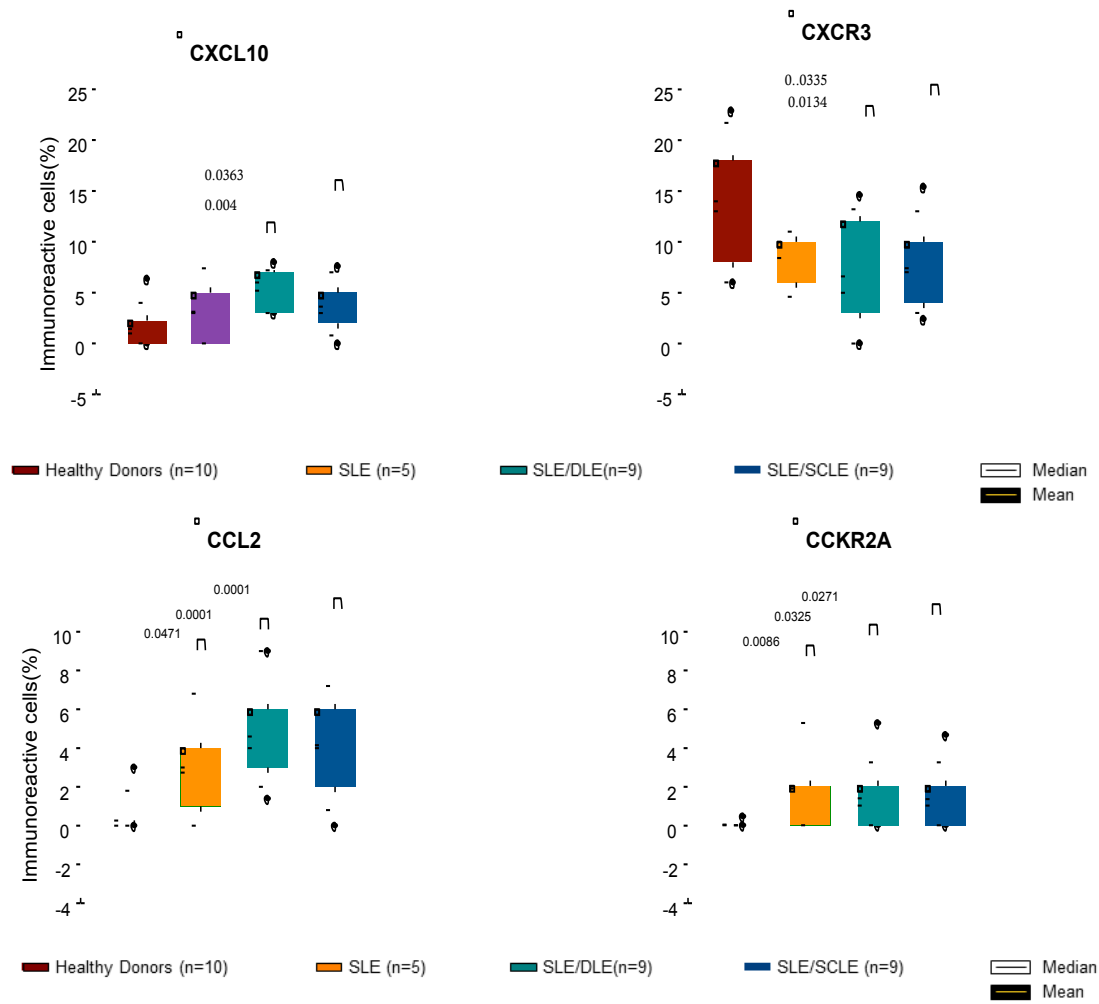


Figura 2.1. Porcentaje de células inmunorreactivas para CXCL10, CXCR3, CCL2 y CCR2A en biopsias de piel de pacientes con LEC. **(A)** CXCL10, **(B)** CXCR3, **(C)** CCL2 y **(D)** células CCR2A. Los resultados se expresan como media (línea negra), mediana (línea blanca) y percentiles 5/95.

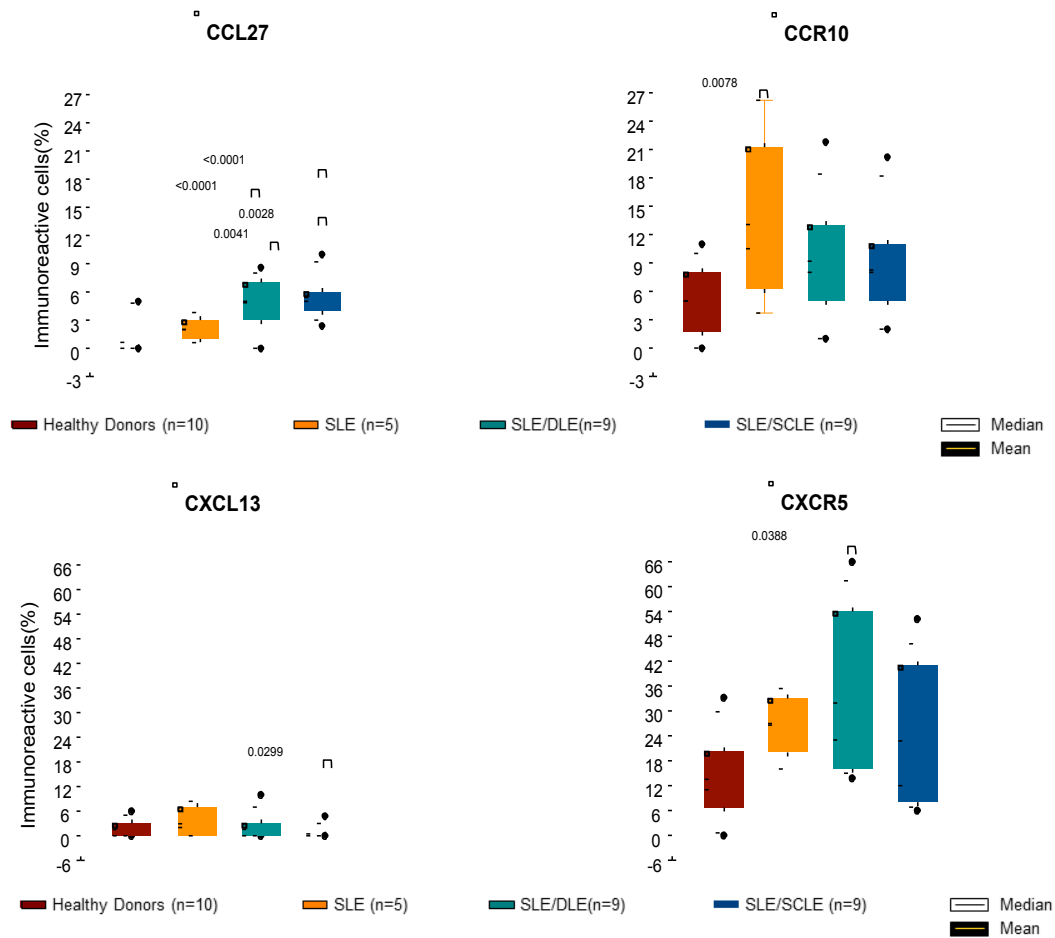


Figura 3.1. Porcentaje de células inmunorreactivas para CCL27, CCR10, CXCL13 y CXCR5 en biopsias de tejido de pacientes con LEC. **(A)** CCL27, **(B)** CCR10, **(C)** CXCL13 y **(D)** células CXCR5. Los resultados se expresan como media (línea negra), mediana (línea blanca) y percentiles 5/95.

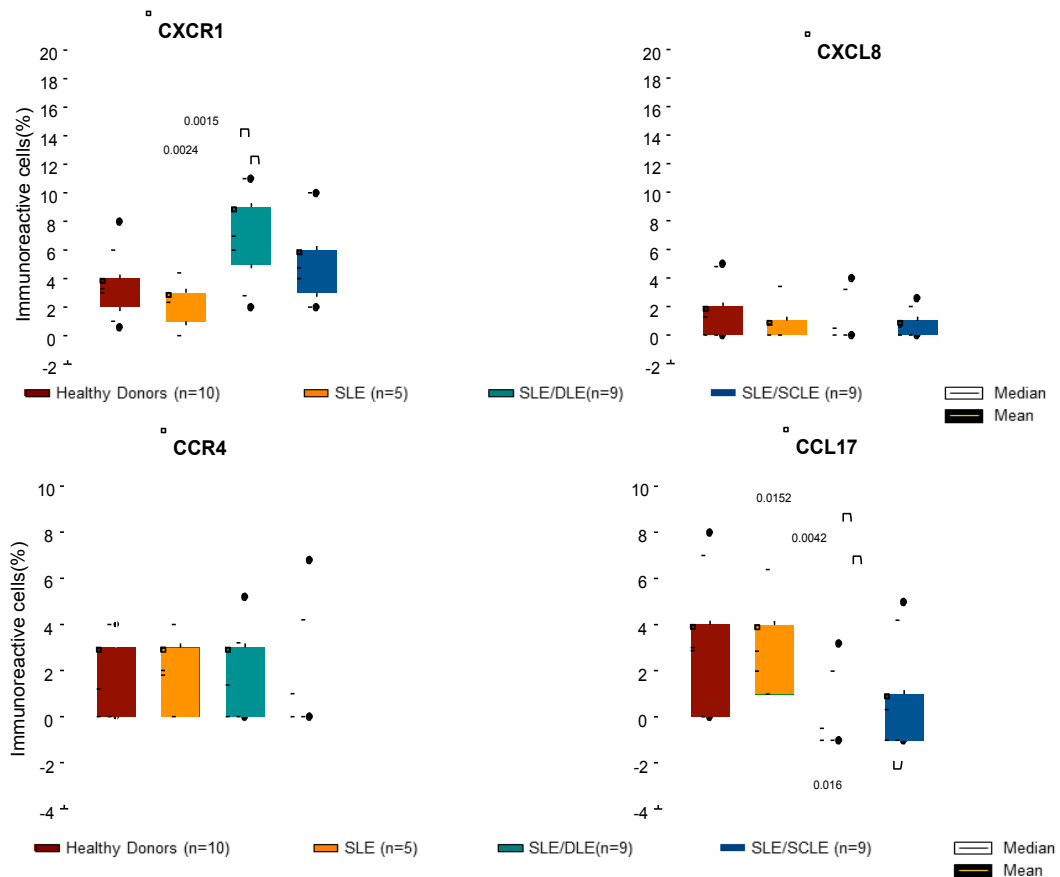


Figura 4.1. Porcentaje de células inmunorreactivas para CXCL8, CXCR1, CCL17 y CCR4 en biopsias de piel de pacientes con LEC. **(A)** CXCR1, **(B)** CXCL8 **(C)** CCL17 y **(D)** células CCR4. Los resultados se expresan como mediana (línea blanca) y percentiles 5/95.

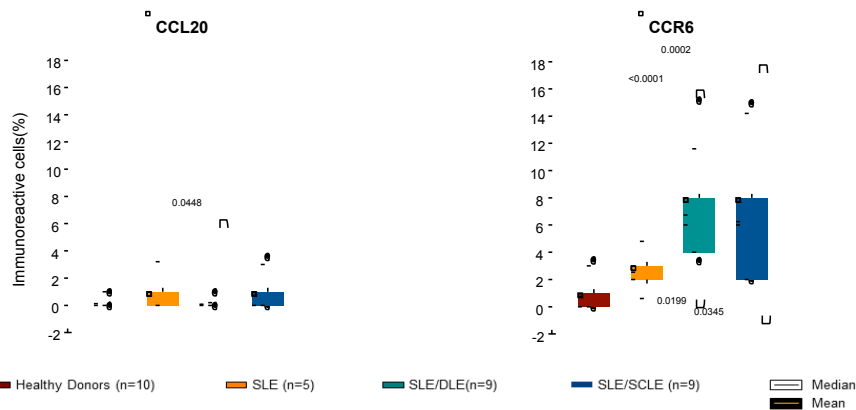


Figura 5.1. Porcentaje de células inmunorreactivas para CCL20 y CCR6 en biopsias de piel de pacientes con LEC. **(A)** CCL20, **(B)** CCR6. Los resultados se expresan como media (línea negra), mediana (línea blanca) y percentiles 5/9.

VII.1.2. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS Y LAS SUBPOBLACIONES CELULARES CIRCULANTES Y TISULARES.

Correlación de poblaciones celulares tisulares y la expresión de quimiocinas.

- La expresión de las células Th22 en el tejido se correlaciona positivamente con la expresión de CCL27, CXCR1 y CXCL10, mientras que lo hace de manera negativa con su receptor CXCR3, así como con CXCL8 y CCL17 (Anexo 2).
- La expresión de las células Th17 se correlaciona positivamente con la expresión de CXCL10 y CXCR1, negativamente con CCL17 y CCL20.
 - La expresión de células Th2 se correlaciona positivamente con la expresión de CCL2 y CCL27 (Anexo 2).
 - La expresión de las células Th1 se correlaciona positivamente con la expresión de CCL2, CCR6, CCL27 y negativamente con CCL17

- La expresión de las células Treg se correlaciona positivamente con la expresión de CXCL10, CCL17, CCR6 y CXCR1, mientras que se correlaciona negativamente con CCL17 (Anexo 2).
- La expresión de las células pDC se correlaciona positivamente con la expresión de CCR6 (Anexo 2).

Correlaciones de la expresión de quimiocinas en la piel con poblaciones celulares en sangre periférica.

- La presencia de células Th22 en suero se correlaciona positivamente con la expresión de CXCL10, CCL2, CKR2A, CCR6, CCL27 y CXCR1, mientras que es negativa con la expresión de CXCR3 y CCL17 (Anexo 3).
- La expresión de células Th17 en suero se correlaciona positivamente con CXCL10, CCL2, CKR2A, CCR6, CCL27, CXCR1 y CXCR5 (Anexo 3).
- La expresión de células Th2 en suero se correlaciona positivamente con CXCL10, CCL2, CCR6 / CCL20, CCL27 / CCR10 y CXCR5 (Anexo 3).
- La expresión de células Th1 en suero se correlaciona positivamente con CXCL10, CCL2 / CKR2A, CCR6, CCL27 / CCR10 y CXCR5 (Anexo 3).
- La expresión de las células Treg en suero se correlaciona positivamente con la expresión de CXCR1 y negativamente con la expresión de CCL20 y CXCR5 (Anexo 3).

- La expresión de células Breg en suero se correlaciona positivamente con la expresión de CXCL10, CCL2, CCR6, CCL27 y CXCR5; mientras que lo hace de manera negativa con la expresión de CCL17 y CXCL8 (Anexo 3).
- La expresión de pDC en suero se correlaciona positivamente con la expresión de CXCL10, CCL2 / CKR2A, CCR6, CCL27 / CCR10 y CXCR5 (Anexo 3).

VII.2. DETERMINACIÓN DE NIVELES CIRCULANTES DE mIRNAS

Las características clínicas y demográficas de los grupos incluidos para este análisis se resumen en la **Tabla 1.2**. No encontramos diferencias significativas con respecto a la duración del LEG, dosis de prednisona, uso de antipalúdicos y otros inmunosupresores entre los grupos con LEC. Sin embargo, como se esperaba, la mediana de la puntuación de la actividad CLASI en pacientes con LECS fue mayor que la puntuación de los pacientes con LED.

Tabla 1.2 Características Demográficas y Clínicas

	Lupus Eritematoso Cutáneo		Sanos (n=19)	P
	LECS (n=22)	LED (n=20)		
<i>Demográficas</i>				
Edad (años)				
Mediana	34.5	32.5	45	0.208
Intervalo (min-máx)	(20-62)	(18-74)	(21-76)	
Sexo (femenino %)	95.50%	95%	95%	0.315
Duración de enfermedad (años)				
Mediana	6	7		0.757
Intervalo (min-máx)	(1-41)	(1-26)		
<i>Variables de Laboratorio</i>				
Leucocitos (cél/s/mL)				
Mediana	5,800	4,900	6,300	0.09
Intervalo (min-máx)	(2,200-43,000)	(2,400-67,000)	(4,200-11,140)	
Linfocitos (%)				
Mediana	19	22.6	29.9	0.069
Intervalo (min-máx)	(8-33)	(14.9-33.5)	(18.1-47.2)	
VSG (mmHg)				
Mediana	11	8	6	0.145
Intervalo (min-máx)	(2-56)	(2-28)	(2-18)	
Anti-dsDNA (IU/mL)				
Mediana	49	12.5	---	0.237
Intervalo (min-máx)	(12-570)	(7.7-1,116)	---	
C3 (mg/dL)				
Mediana	68.5	78.7	---	0.384
Intervalo (min-máx)	(29.4-130)	(28.8-132)	---	
C4 (mg/dL)				
Mediana	13.5	14.3	---	0.928
Intervalo (min-máx)	(5.9-37.2)	(6-29)	---	
<i>Variables Clínicas</i>				
CLASI actividad				
Mediana	20	12.5	---	0.013
Intervalo (min-máx)	(9-37)	(2-29)	---	
Dolor				
Mediana	6.5	5	---	0.069
Intervalo (min-máx)	(0-9)	(0-10)	---	
Prurito				
Mediana	7	6	---	0.36
Intervalo (min-máx)	(0-10)	(0-10)	---	
Prednisona (mg/día)				
Mediana	10	15	---	0.520
Intervalo (min-máx)	(5-50)	(2-20)	---	
Antimaláricos (%)	63	65	---	0.531

LECS: Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo; **LED:** Lupus Eritematoso Discoide.

El análisis reveló niveles circulantes diferenciales de seis de los once miRNA elegidos para su estudio: miR-150, miR-23b, miR-1246, miR-21, miR-31 y miR-146, entre los pacientes con LEC (LECS y LED) en comparación con controles (Figura 1.2). En este sentido, los niveles circulantes de miR-1246 (disminución de 372.7 veces), miR-150 (disminución de 183.1 veces), miR-21 (disminución de 14.7 veces), miR-23b (disminución de 14 veces) y miR-146 (Disminución de 13 veces) fueron considerablemente expresados a la baja en pacientes con LECS en comparación con controles. Los pacientes con LED también tenían niveles más bajos (expresión a la baja) de miR-21 (disminución de 4.6 veces), miR-1246 (3.8 veces) y miR-150 (1.7 veces) en comparación con sanos. Cuando comparamos el grupo con LECS versus LED, el grupo pacientes con LECS tenía niveles más bajos de miR-1246 (75.5 veces menos), miR-146 (40.6 veces menor) y miR23b (23.2 veces menor). Para determinar una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, y posteriormente, para evaluar comparaciones múltiples entre los grupos se utilizó la prueba de Dunn, considerándose una p significativa < 0.05 (**Tabla 2a y 2b**) y (**Figura 1.2**).

Tabla 2a. Niveles séricos de microRNAs en pacientes con Lupus Cutáneo y en controles

	LECS (n=22)	LED (n=20)	Sanos (n=19)	P
miRNA - 29a				
Median	0.4935	7.1930	5.2317	NS
Intervalo	(0.0290 - 1.5526)	(0.1490 - 34.8004)	(0.03875 - 19.4556)	
miRNA - 29b				
Median	0.38862	4.04661	0.80666	NS
Intervalo	(0.3886 - 0.3886)	(0.0005 - 7.9243)	(0.2917 - 3.4296)	
miRNA - 150				
Median	0.00803	0.54470	1.47879	0.0014
Intervalo	(0.0001 - 1.17097)	(0.02122 - 7.57296)	(0.03047 - 15.81041)	
miRNA - 23b				
Median	0.080079	1.940658	1.205179	0.0102
Intervalo	(0.00278 - 5.93931)	(0.01009 - 141.36614)	(0.04548 - 134.80546)	
miRNA - 1246				
Median	0.030826	2.359270	11.521843	0.0019
Intervalo	(0.00162 - 1.23233)	(0.00260 - 11.52185)	(0.00027 - 26.67303)	
miRNA - 21				
Median	0.063731	0.177584	1.005151	0.0015
Intervalo	(0.00497 - 1.690944)	(0.00346 - 50.44598)	(0.07940 - 23.65619)	
miRNA - 31				
Median	0.18494282	0.327977441	0.668150105	0.0084
Intervalo	(0.03294 - 0.58647)	(0.21922 - 1.32356)	(0.26449 - 3.03845)	
miRNA - 146				
Median	0.066828	2.785696	0.939055	0.0033
Intervalo	(0.00153 - 6.52258)	(0.03784 - 221.53405)	(0.02201 - 111.63529)	
miRNA - 155				
Median	0.677316	1.158678	0.824067	NS
Intervalo	(0.67732 - 0.67732)	(0.00614 - 11.48636)	(0.33313 - 10.08294)	
miRNA - 485				
Median	2.048471	5.869674	0.512835	NS
Intervalo	(1.71129 - 2.38565)	(0.10044 - 227.44145)	(0.23037 - 16.62586)	
miRNA - 197				
Median	0.38687	0.45724	1.20925	NS
Intervalo	(0.01270 - 2.15287)	(0.00186 - 5.33757)	(0.01757 - 5.27006)	

*Prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 2b. Expresión de microRNAs circulantes que fueron significativamente diferentes entre los pacientes con LEC y controles

	miRNA - 150	miRNA - 23b	miRNA - 1246	miRNA - 21	miRNA - 31	miRNA - 146
LECS vs. LED	NS	0.0153	0.0332	NS	NS	0.0332
LECS vs. Sanos	< 0.0001	0.006	< 0.0001	0.0002	NS	0.0452
LED vs. Sanos	0.0015	NS	0.0043	0.0408	NS	NS

LECS: Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo; LED: Lupus Eritematoso Discoide.
Prueba de Kruskal-Wallis, análisis post-hoc prueba de Dunn.

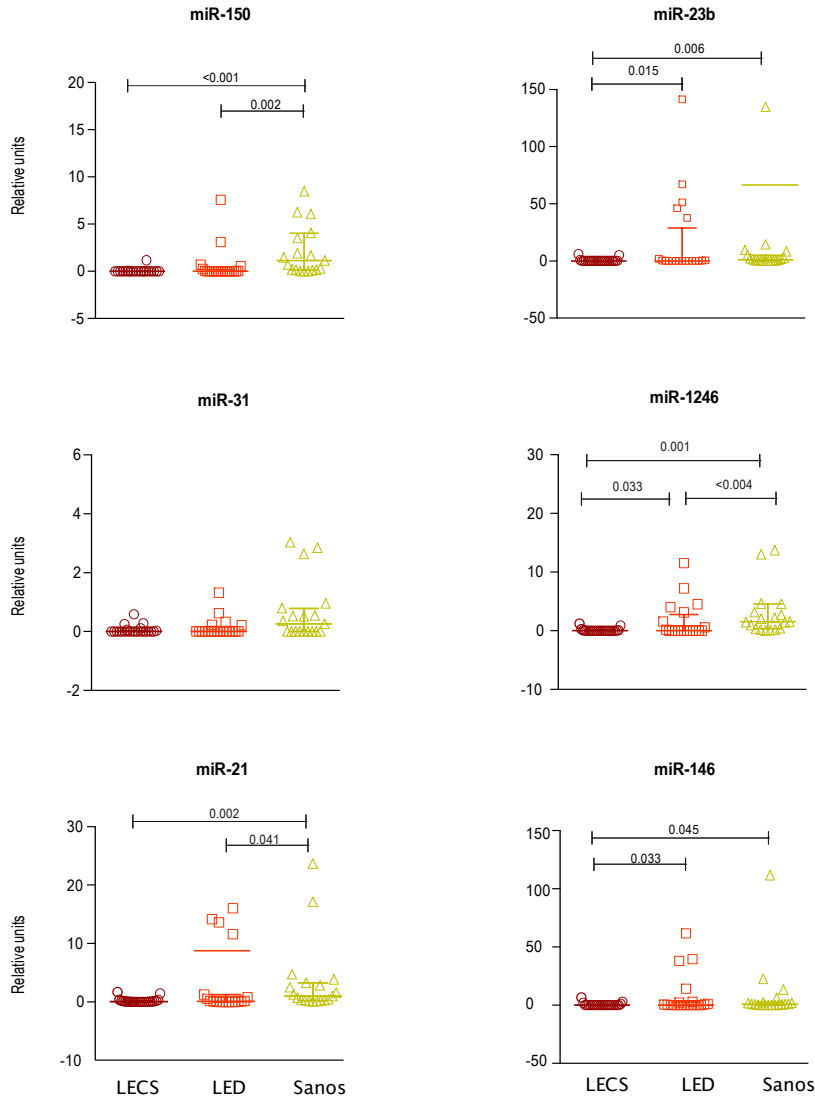


FIGURA 1.2: Expresión sérica diferencial de miRNAs. *Los resultados se expresan como la mediana (percentiles 5° / 95°). Prueba de Kruskal-Wallis y análisis post-hoc (prueba de Dunn). LECS, lupus eritematoso cutáneo subagudo; LED, lupus eritematoso discoide.

VII.2.2. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES SÉRICOS DE mRNAs Y LA PUNTUACIÓN DE ACTIVIDAD CLASI.

A excepción de miR-150 en el subgrupo de pacientes con LECS ($\rho = -0.64$ IC 95% -0.78 a -0.11 , $P = 0.01$), no encontramos ninguna correlación entre el puntaje de actividad CLASI y otros niveles de miRNAs circulantes.

VII.2.3. ASOCIACIONES DE mRNAs Y SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS CIRCULANTES Y CUTÁNEAS.

Realizamos un análisis de regresión múltiple para evaluar la asociación de los miRNAs con diferencias significativas entre los grupos estudiados y las diferentes poblaciones celulares circulantes y de tejido (piel afectada).

En sangre periférica, en el grupo de pacientes con LECS, observamos una asociación negativa con las células CD4+/CD25-/IL-4+ y CD4+/CD25hi/Foxp3+ y miR-23b (**Figura 2.2 (a), (e) y (g), Tabla 3**); y CD4+/CD25-/IFN- γ + con miR-1246 (**Figura 2.2 (a) y (f), Tabla 3**). En el grupo de pacientes con LED hubo una asociación positiva con las células dendríticas plasmacitoides CD123+/CD196+/IDO+ con miR-150 (**Figura 2.2 (b) y (i), Tabla 4**).

En la piel, en el grupo de LECS, se determinó una asociación positiva entre miR-21 y CD4+/IL-4+ (**Figura 3.2 (c), Tabla 3**) y CD20+/IL-10+ (**Figura 3.2 (f), Tabla 3**) y CD4+/IFN- γ + con miR-31 (**Figura 3.2 (d), Tabla 3**). En el grupo de pacientes con LED, las células CD4+/IL-4+ se asociaron positivamente con miR-150 (**Figura 3.2 (c), Tabla 4**) y las células CD20+/IL-10+ con miR-1246 y miR-146a (**Figura 3.2 (f), Tabla 4**).

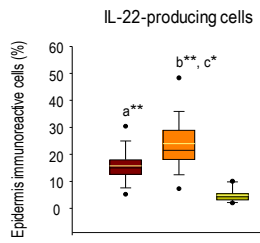
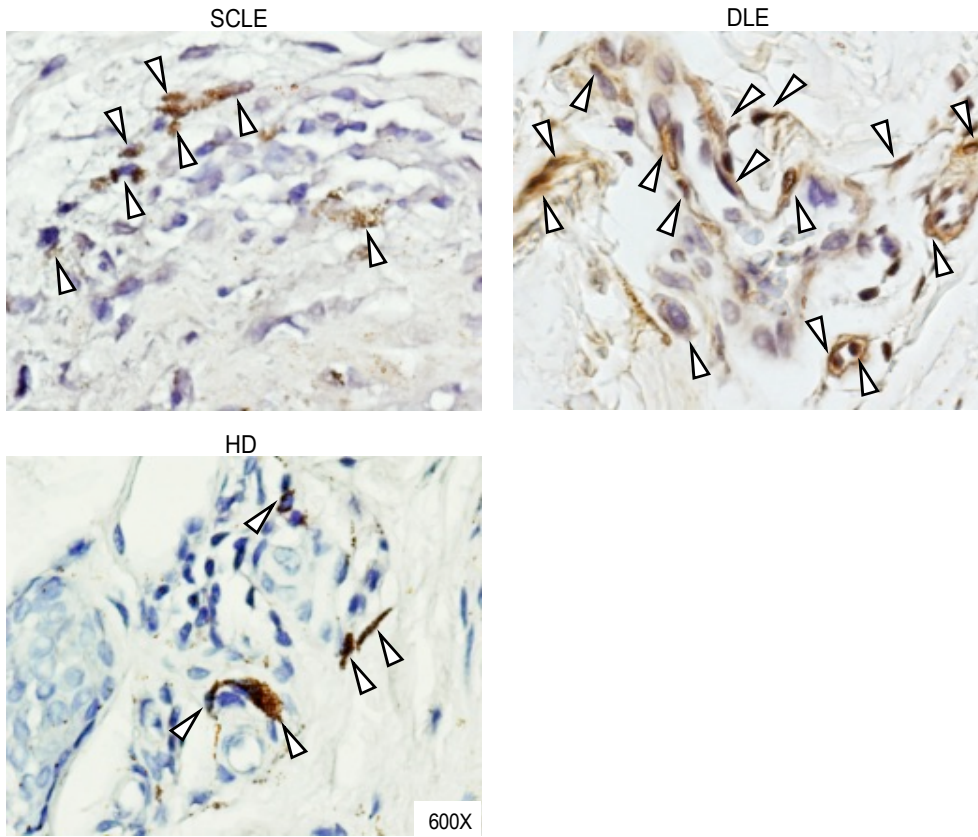
Tabla 3. Modelos de Regresión Lineal Múltiple de pacientes con LECS

	Modelo	miRNAs	R	R ²	β	t	Sig. (P)	95% IC para β	
								menor	mayor
Células Periféricas									
	1	miR-23b	0.493	0.244	-0.493	-2.407	0.027	-0.901	-0.061
	1	miR-1246	0.431	0.186	-0.431	-2.908	0.006	-0.399	-0.071
	1	miR-23b	0.449	0.201	-0.449	-2.13	0.047	-1.47	-0.01
Células en Tejido (piel)									
	1	miR-21	0.487	0.237	0.487	2.365	0.029	0.425	7.171
	1	miR-31	0.467	0.218	0.467	2.238	0.038	0.717	22.62
	1	miR-21	0.492	0.242	0.492	2.396	0.028	0.61	9.298

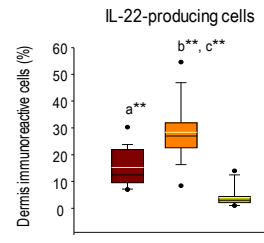
Tabla 4. Modelos de Regresión Lineal Múltiple de pacientes con LED

	Modelo	miRNAs	R	R ²	β	t	Sig. (P)	95% IC para β	
								menor	mayor
Células Periféricas									
	1	miR-150	0.448	0.201	0.448	2.125	0.048	0.009	1.54
Células en Tejido (piel)									
	1	miR-150	0.517	0.267	0.517	2.562	0.020	0.27	2.728
	1	miR-1246	0.75	0.563	0.75	4.811	<0.001	0.613	1.563
	2	miR-1246	0.809	0.655	0.859	5.672	<0.001	0.782	1.709
	2	miR-146a			-0.322	-2.13	0.048	-0.165	-0.001
	1	miR-1246	0.736	0.542	0.736	4.611	<0.001	0.83	2.22
	2	miR-1246	0.673	0.634	0.866	5.874	<0.001	1.15	2.439
		miR-146a			-0.385	-2.612	0.018	-0.256	-0.027

(a) IL-22-expressing cells

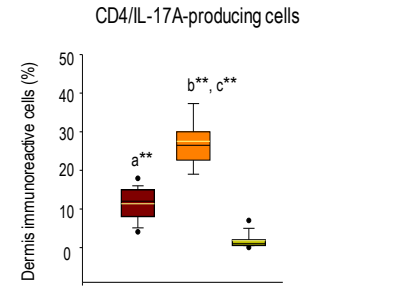
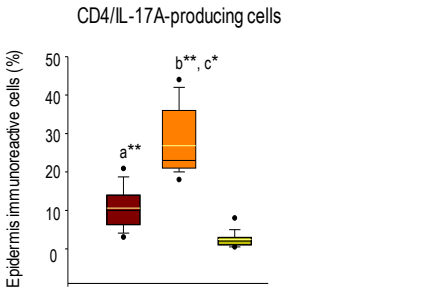
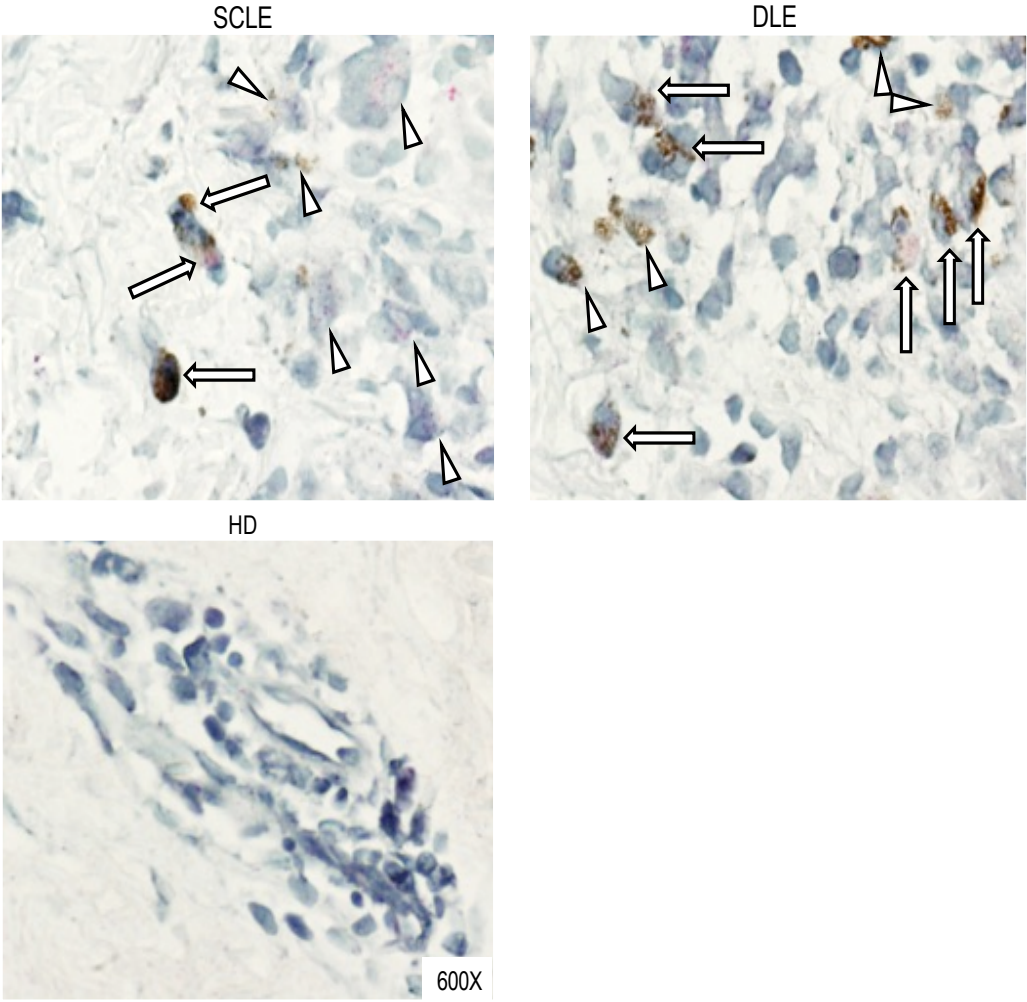


a HD versus SCLE * $P < 0.05$
 b HD versus DLE ** $P < 0.001$
 c SCLE versus DLE



Legend:
 ■ SCLE (n=22)
 ■ DLE (n=20)
 ■ HD (n=19)
 □ Median
 □ Mean
 ▭ 5th/95th percentiles

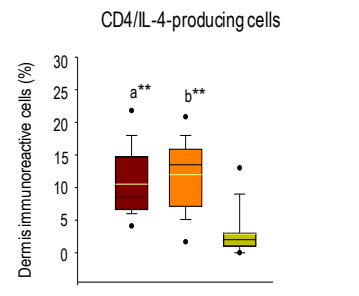
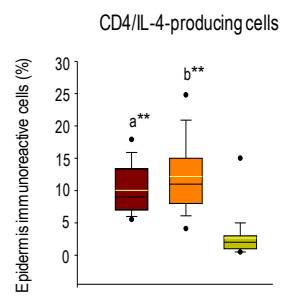
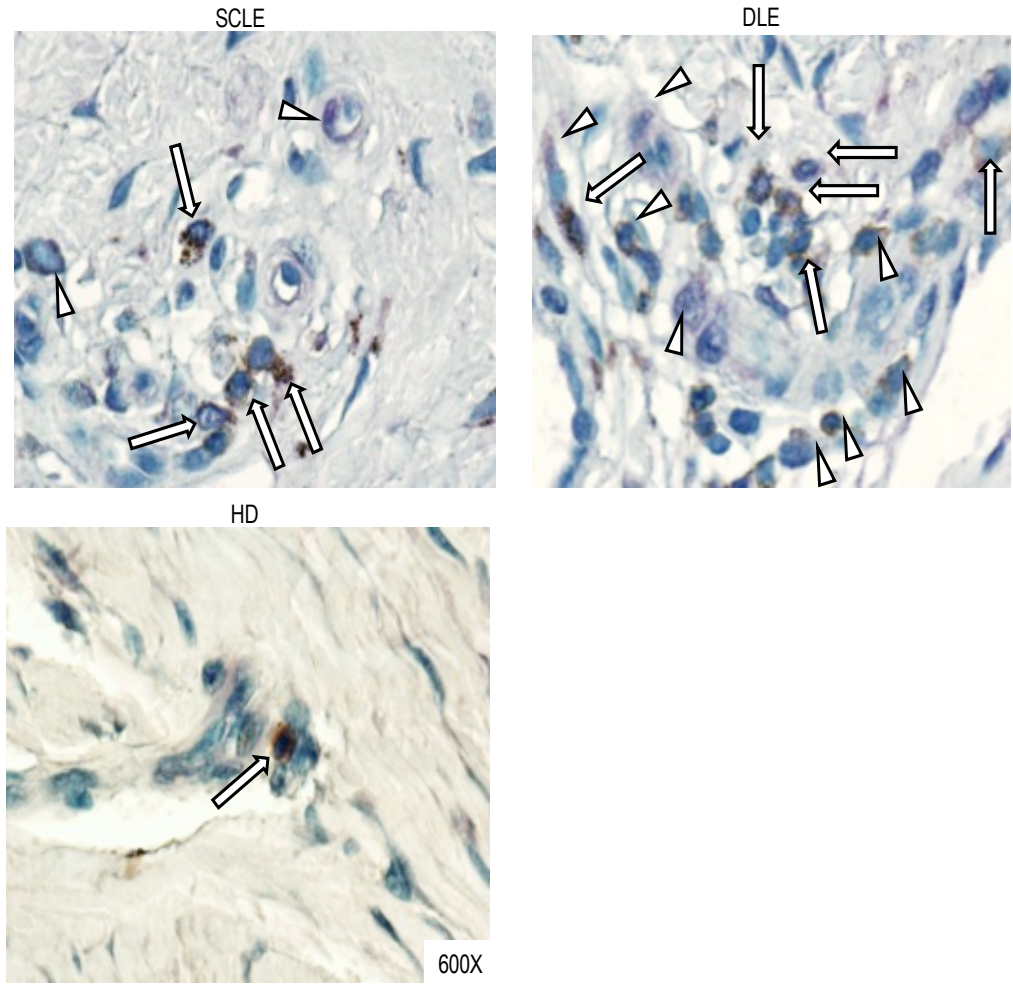
(b) CD4/IL-17A-expressing cells



a HD versus SCLE * P<0.05
 b HD versus DLE ** P<0.001
 c SCLE versus DLE

SCLE (n=22) Median
 DLE (n=20) Mean
 HD (n=19) 5th/95th percentiles

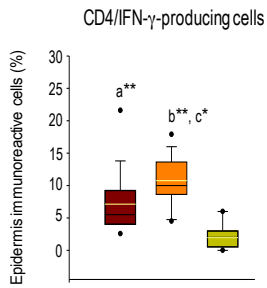
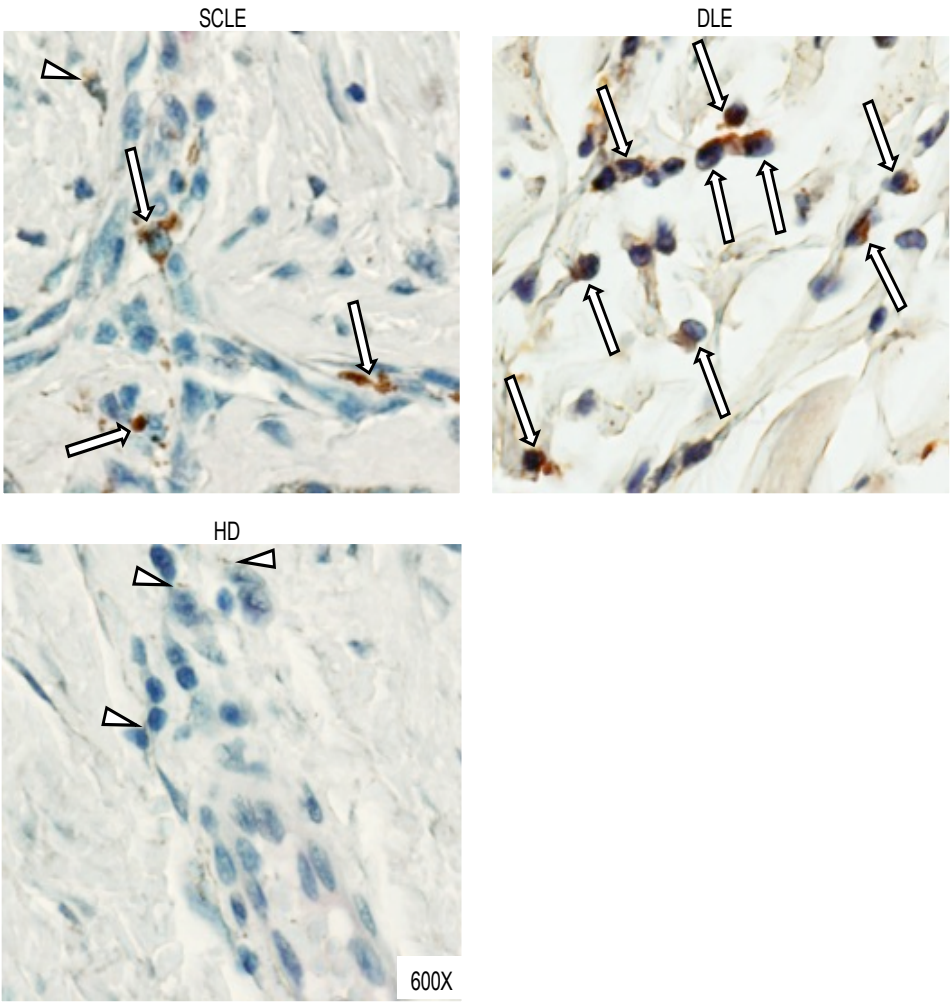
(c) CD4/IL-4-expressing cells



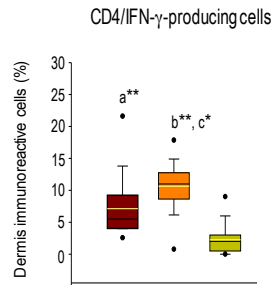
a HD versus SCLE * $P < 0.05$
 b HD versus DLE ** $P < 0.001$
 c SCLE versus DLE

■ SCLE (n=22) ▬ Median
 ■ DLE (n=20) ▬ Mean
 ■ HD (n=19) T 5th/95th percentiles

(d) CD4/IFN- γ -expressing cells

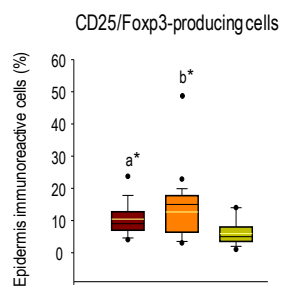
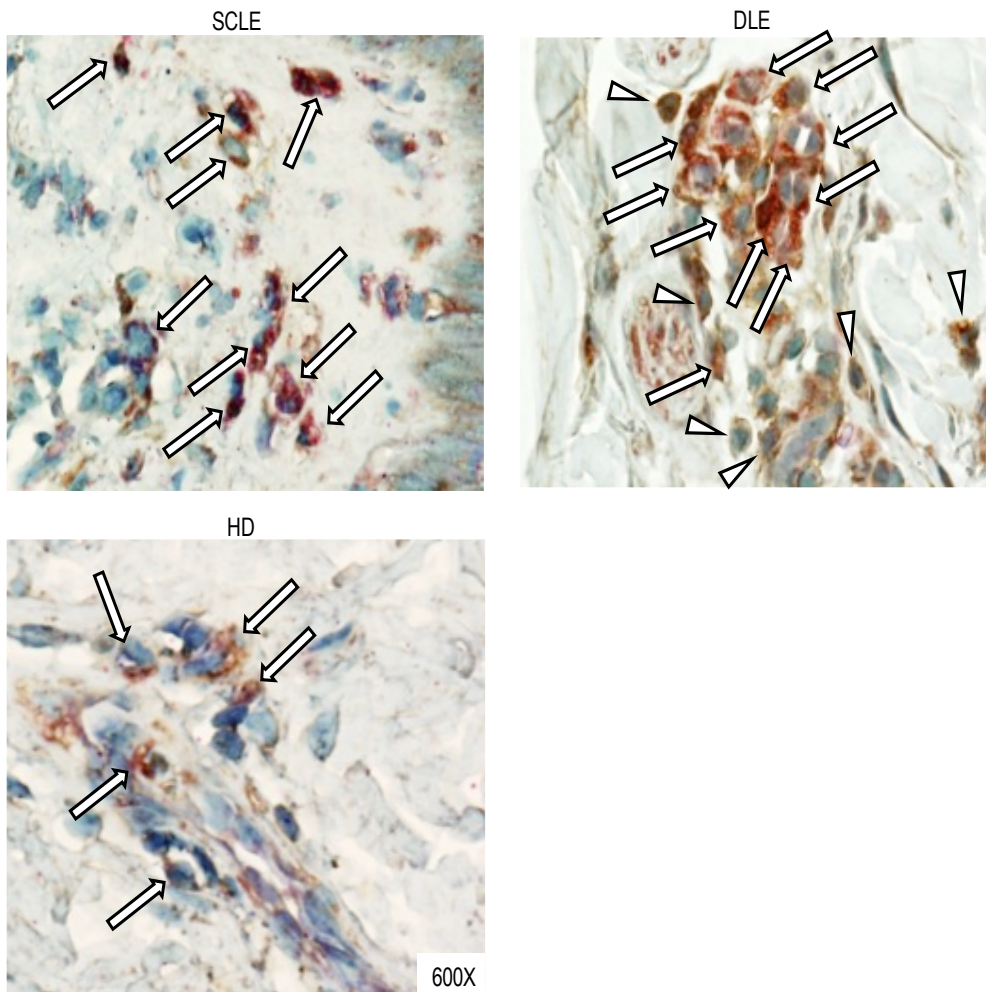


a HD versus SCL * $P < 0.05$
 b HD versus DLE ** $P < 0.001$
 c SCL versus DLE

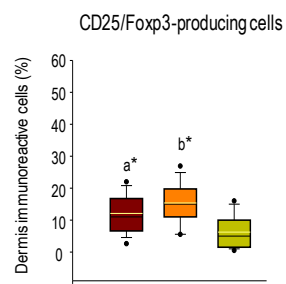


■ SCL (n=22) ▭ Median
 ■ DLE (n=20) ▭ Mean
 ■ HD (n=19) ▭ 5th/95th percentiles

(e) CD25/Foxp3-expressing cells

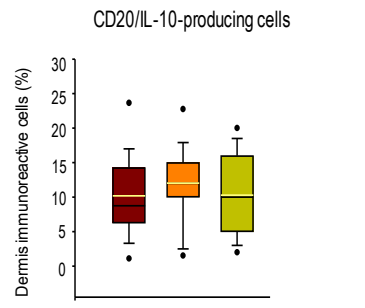
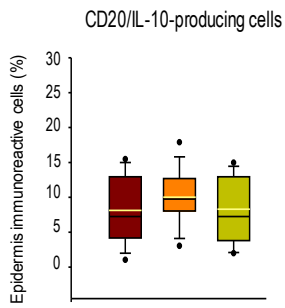
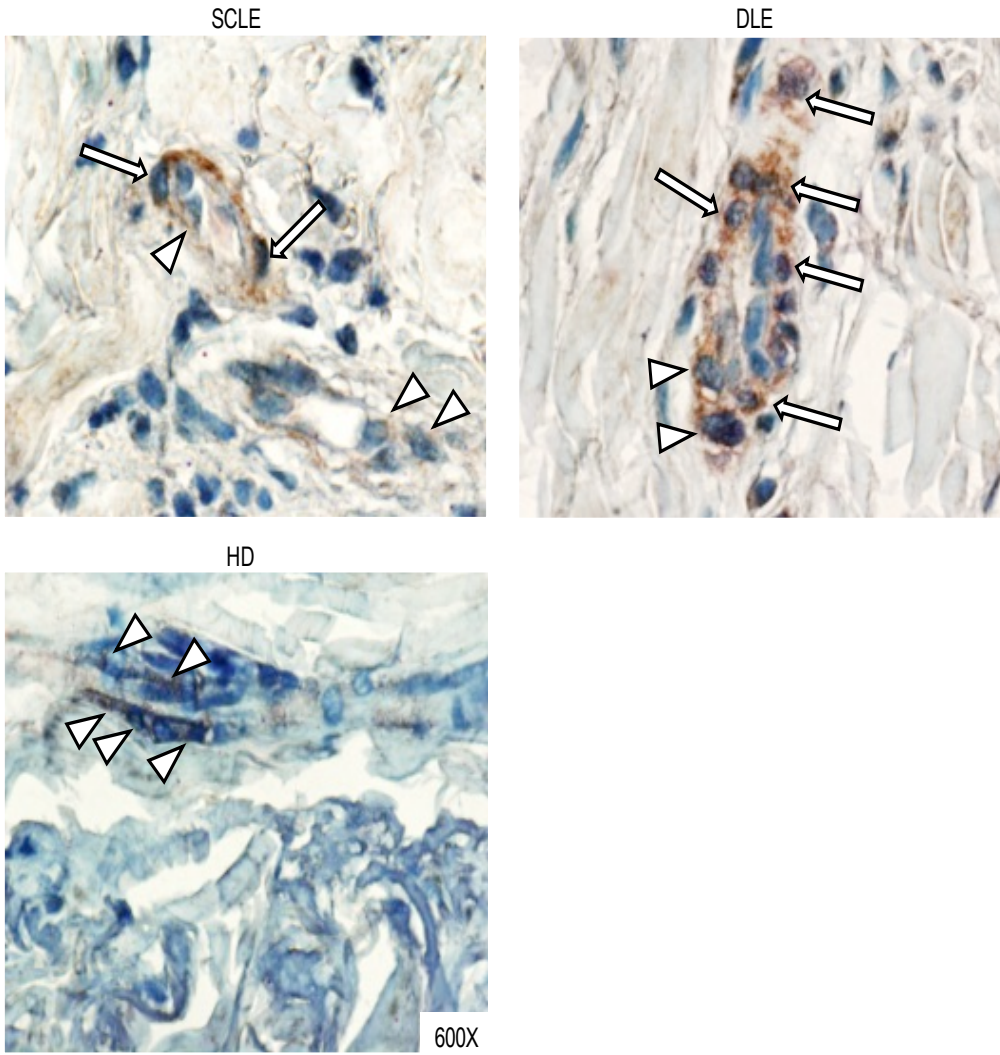


a HD versus SCLE * $P < 0.05$
 b HD versus DLE ** $P < 0.001$
 c SCLE versus DLE



■ SCLE (n=22) ▬ Median
 ■ DLE (n=20) ▬ Mean
 ■ HD (n=19) T 5th/95th percentiles

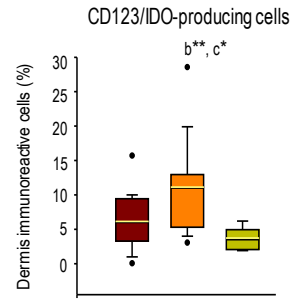
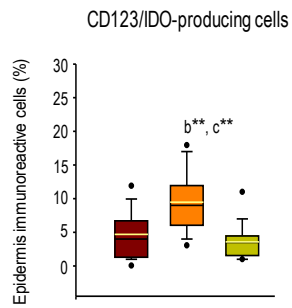
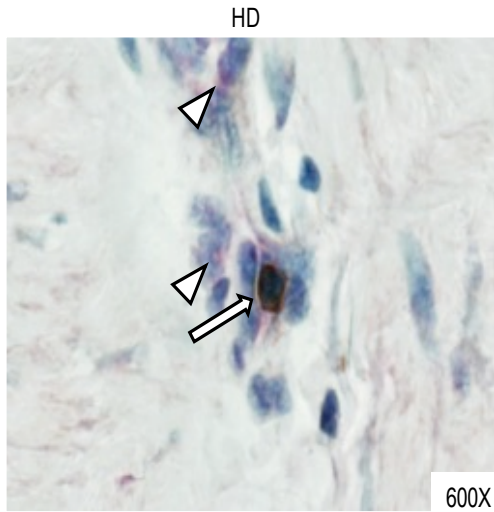
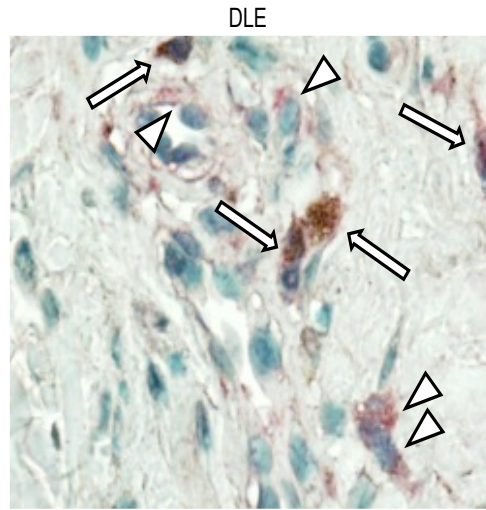
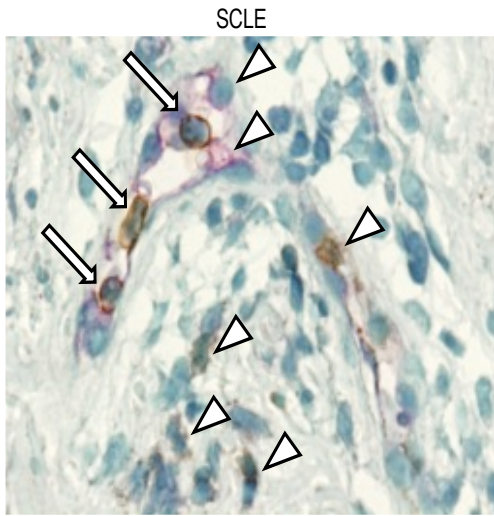
(f) CD20/IL-10-expressing cells



- a HD versus SCLC * $P < 0.05$
- b HD versus DLE ** $P < 0.001$
- c SCLC versus DLE



(g) CD123/IDO-expressing cells



- a HD versus SCLE * $P < 0.05$
- b HD versus DLE ** $P < 0.001$
- c SCLE versus DLE

- SCLE (n=22)
- DLE (n=20)
- HD (n=19)
- ▭ Median
- ▬ Mean
- ┌ 5th/95th percentiles

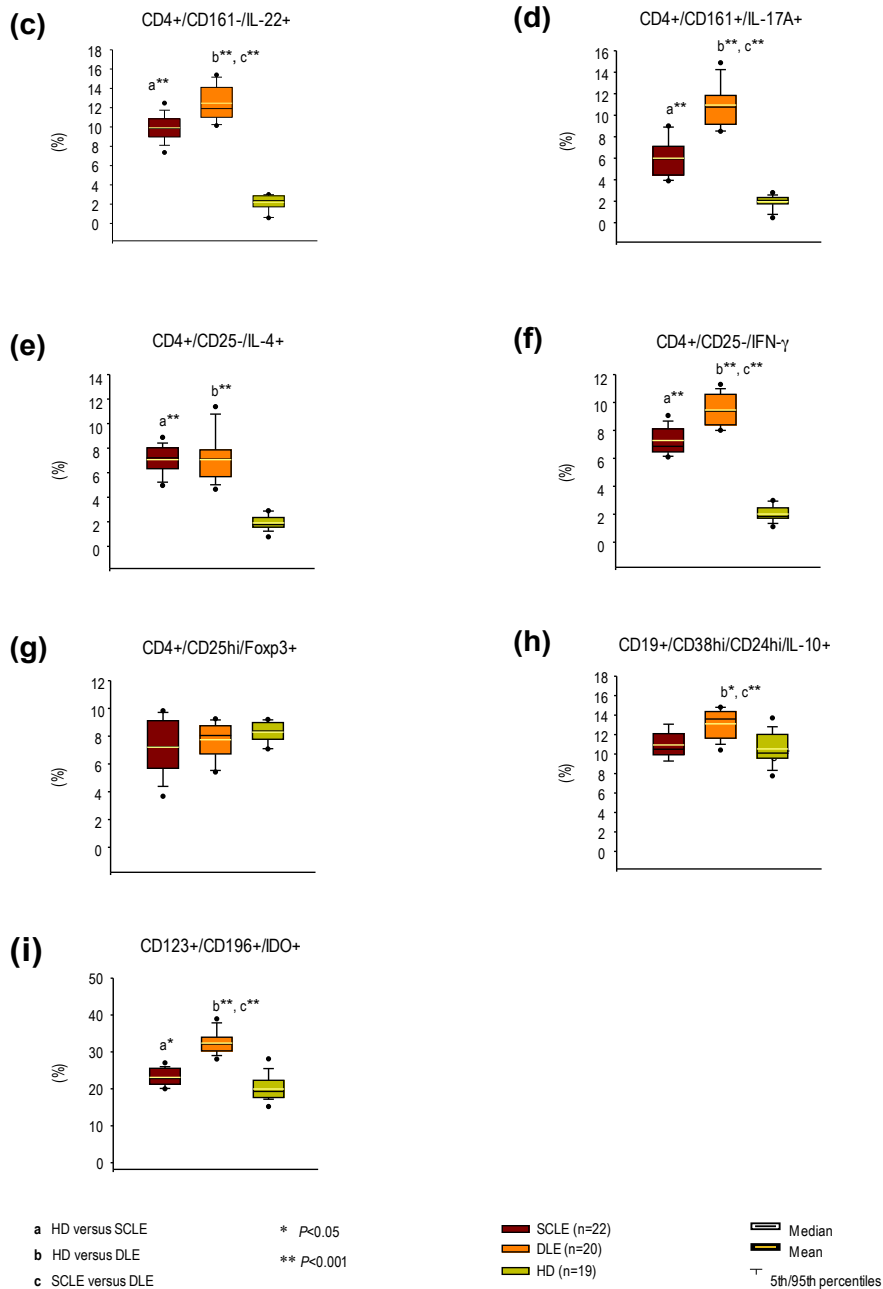
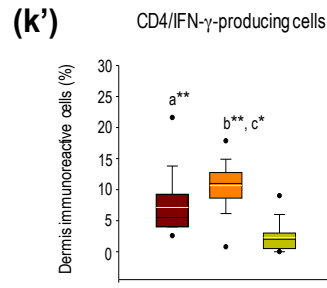
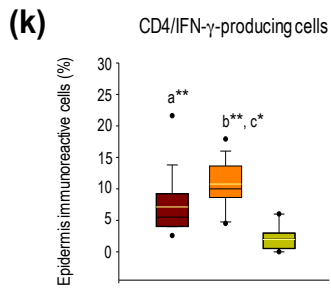
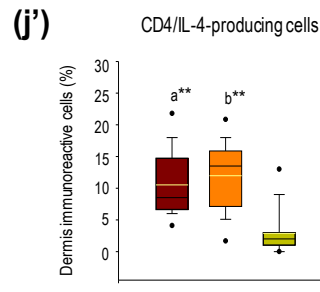
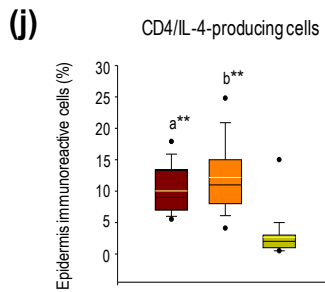
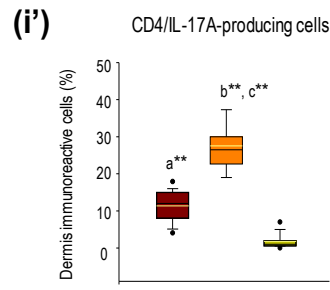
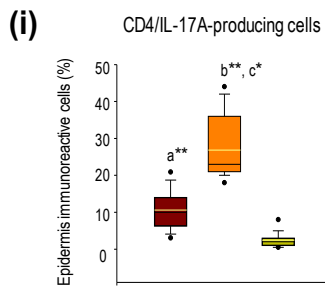
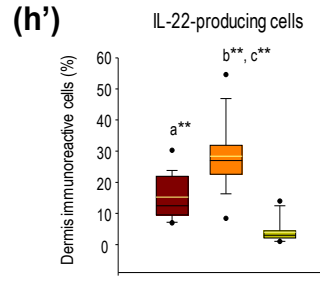
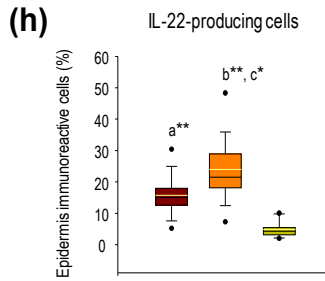


FIGURA 2.2: Porcentajes de células circulantes (c) CD4+/CD161-/IL-22+, (d) CD4+/CD161+/IL-17A+, (e) CD4+/CD25-/IL-4+, (f) CD4+/CD25-/IFN- γ +, (g) CD4+/CD25hi/Foxp3+, (h) CD19+/CD38hi/IL-10+, y (i) CD123+/CD196-/IDO+. Los resultados se expresan como la media (línea amarilla horizontal), la mediana (línea negra horizontal) y los percentiles 5/95. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.001$. SCL, lupus eritematoso cutáneo subagudo; DLE, lupus eritematoso discoide; HD, donadores sanos.



a HD versus SCLE * $P < 0.05$
 b HD versus DLE ** $P < 0.001$
 c SCLE versus DLE

■ SCLE (n=22) ▬ Median
 ■ DLE (n=20) ▬ Mean
 ■ HD (n=19) ▬ 5th/95th percentiles

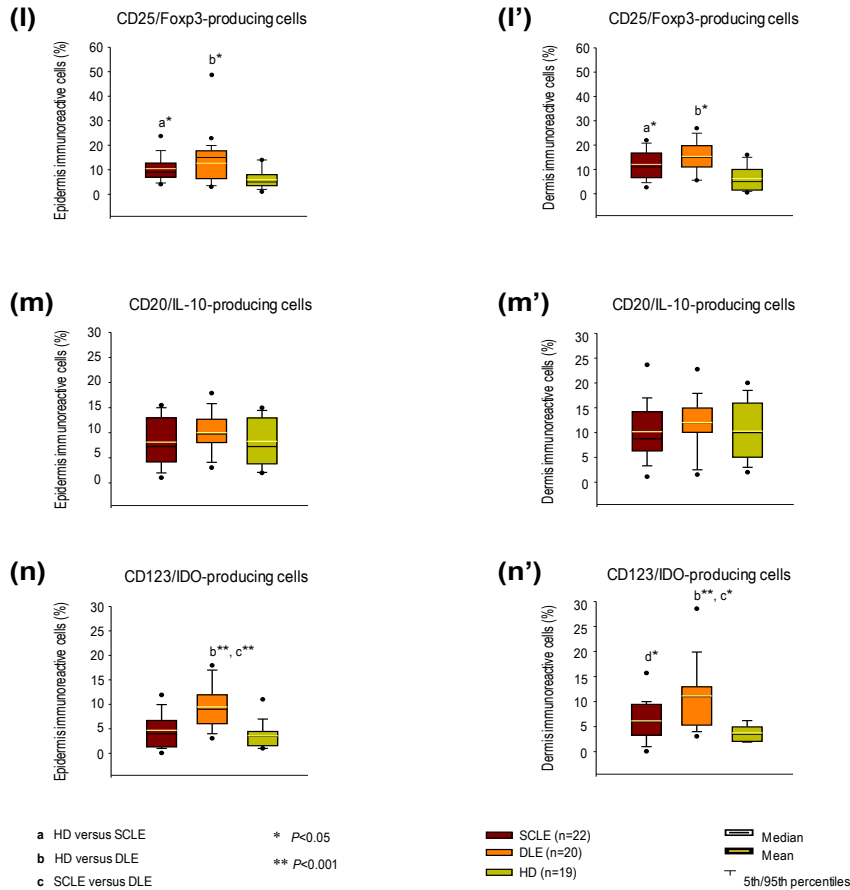


FIGURA 3.2: Inmuntinción representativa de (a) células que expresan IL-22, (b) células T CD4 que expresan IL-17A, (c) células T CD4 que expresan IL-4, (d) células T CD4 que expresan IFN- γ células, (e) células T CD25 que expresan Foxp3, (f) células B CD20 que expresan IL-10 y (g) células dendríticas plasmacitoides CD123 que expresan IDO en biopsias de tejido de lupus eritematoso cutáneo subagudo (SCL, panel superior izquierdo) discoide lupus eritematoso (DLE, panel superior derecho), donantes sanos (HD, panel inferior izquierdo). Las puntas de flecha muestran tinción simple (en marrón o rojo) y las flechas representan tinción doble. La ampliación original fue X600. (h-n) Porcentaje de células inmunorreactivas por campo microscópico. Los resultados se expresan como la media (línea amarilla horizontal), la mediana (línea negra horizontal) y los percentiles 5/95 * P <0.05 y ** P <0.001. SCL, lupus eritematoso cutáneo subagudo; DLE, lupus eritematoso discoide; HD, donantes sanos.

VII.2.4. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE LOS miRNA EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN PACIENTES CON LECS Y LED.

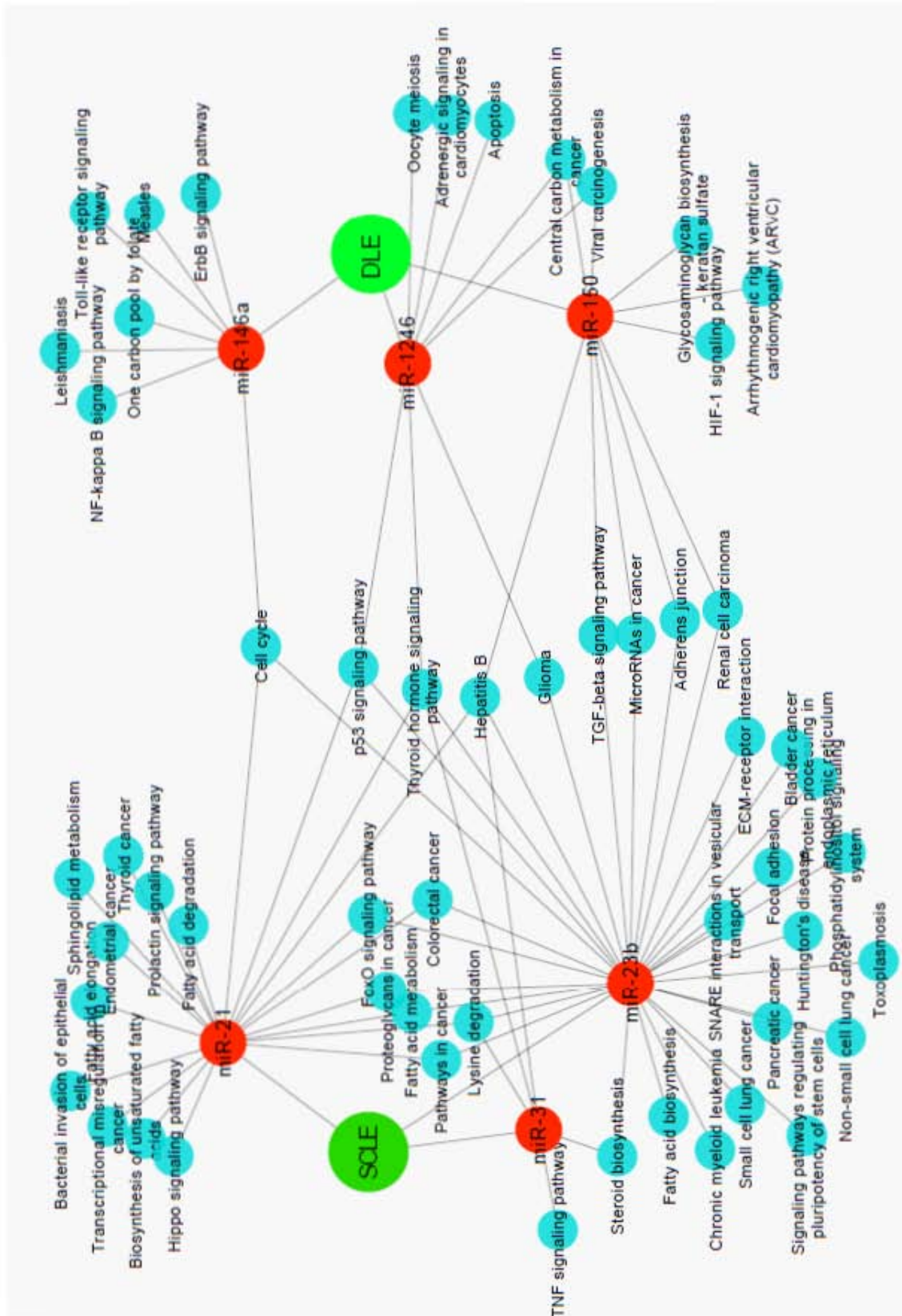
Los objetivos y vías pronosticados de los miRNA expresados diferencialmente y su correlación con subpoblaciones específicas de células T circulantes y de piel en ambas condiciones clínicas (LECS: miR-21, 31 y 23b y LED: miR-150, miR-1246 y miR-146a) fueron analizados utilizando la estrategia de enriquecimiento de la vía KEGG. El análisis de los objetivos y las rutas predichas reveló que en LECS, miR-21 estaba relacionado con la señalización de hipopótamos???, la invasión bacteriana de las células epiteliales, la regulación transcripcional del cáncer, la señalización de prolactina, la señalización de FoxO y la biosíntesis y degradación de los ácidos grasos. Curiosamente, miR-31 también estaba relacionado con las vías del cáncer asociadas a miR-21 y miR-23b. Además, encontramos que miR-31 se asoció significativamente con la señalización de TNF.

Con respecto al LED, la expresión de miR-146a se relacionó significativamente con vías inmunes relevantes, incluida la señalización de NF-kappa B, la señalización del receptor tipo-Toll. MiR-1246 se asoció con apoptosis y carcinogénesis viral. Finalmente, miR-150 en LEC estaba estrechamente relacionado con la señalización HIF-1 y las vías del cáncer.

Curiosamente, el análisis de interactoma mostró un grupo de vías que estaban vinculadas con miRNA específicos expresados en pacientes con LECS y LED. En este contexto, la regulación del ciclo celular, la señalización de p53, la señalización de TGF- β , la señalización de la hormona tiroidea y las

vías de cáncer se compartieron entre miR-21, miR-31 y miR-23b (expresado en LECS) y miR-146a, miR-1246 y miR-150 expresado en pacientes con LED (**Figura 4.2**).

Es importante destacar que el grado de asociación entre las firmas de miRNA expresadas diferencialmente y las subpoblaciones de células T específicas observadas en pacientes con LECS y LED, así como las vías de enriquecimiento se muestran en la **Figura 5.2**.



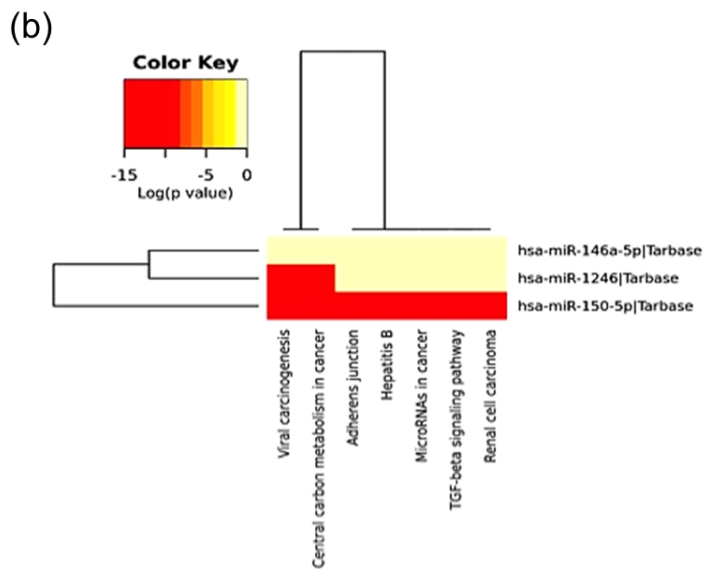
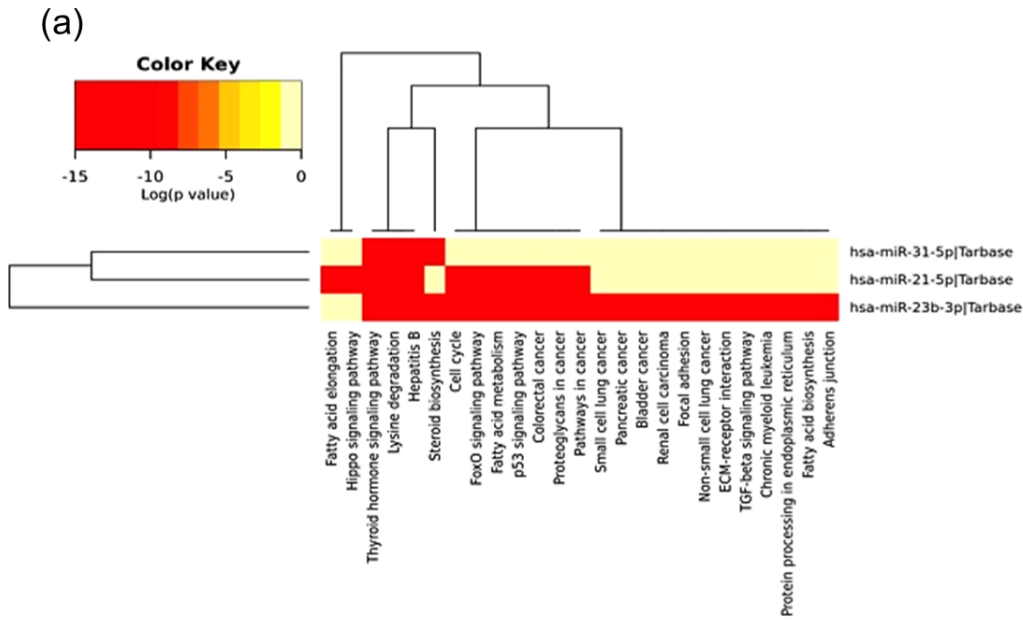


Figura 4.2 y 5.2: (a) Mapa de calor de las rutas KEGG enriquecidas con el gen regulado por la combinación de hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-21-5p y hsa-miR-31-5p (LECS); (b) Mapa de calor de las rutas KEGG enriquecidas con el gen regulado por la combinación de hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1246 y hsa-miR-146a-5p (LED).

VIII. DISCUSIÓN:

-

El lupus eritematoso cutáneo es una entidad clínica compleja cuya fisiopatología aún no se ha caracterizado por completo, pero abarca las interacciones entre la genética, el medio ambiente, las células (queratinocitos, endoteliales, neutrófilos, células dendríticas, células T y B) y sus productos. En este sentido, las quimiocinas y sus receptores están involucrados en la regulación de la infiltración en los sitios inflamatorios celulares. Pocos estudios han evaluado la red de células complejas, citoquinas y quimiocinas en LEC (46)

En un estudio anterior mostramos la participación de células Th22, Th17 y Th1, así como células pDCreg en pacientes con LED y LECS; siendo esta respuesta más intensa en pacientes con lesiones de LED en comparación con LECS (15); aquí exploramos el perfil de quimiocinas entre estos pacientes.

In vitro, los queratinocitos irradiados con radiación UV liberan quimioatrayentes para linfocitos como CCL5, CCL22 y CXCL28 (47). Además, la apoptosis inducida por los rayos UV de los queratinocitos también promueve la liberación de CCL27, una quimiocina que desempeña un papel durante el reclutamiento de células T de memoria CCR10+ en la piel (48). En este trabajo también observamos un aumento de la inmunorreactividad de CCL27 y su receptor CCR10 en pacientes con LEC frente a controles sanos, siendo este hallazgo relevante para el grupo de pacientes con LED; sin embargo, los resultados no difirieron entre pacientes con lupus con y sin

compromiso cutáneo.

Algunos autores han reportado el predominio de la respuesta Th1 en el lupus cutáneo. Los IFN de tipo I producidos por pDCs reclutan linfocitos Th1 para las lesiones al regular la producción de CXCL10 por los queratinocitos y otras células de la piel (46), así como el reclutamiento de linfocitos CXCR3+ en la piel con una disminución concomitante de la sangre periférica (49).

Además, el interferón- γ induce la expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 y también su receptor CXCR3 en la célula Th1 (50). En el tejido del LEC, CXCL10 es más prominente en la interfaz entre la epidermis y la dermis, mientras que los linfocitos CXCR3 positivos invaden la epidermis (51). Además, una mayor expresión de RNAm de CXCL9 y CXCL10 se correlacionó con IFN- γ en diferentes subtipos de LEC, inclusive se ha reportado, una mayor expresión en LECS en comparación con lupus tumidus y lupus discoide (23). También se ha propuesto un equilibrio local de las células T efectoras y reguladoras para CXCL10 no se entiende esta idea (52).

Aquí también corroboramos una mayor expresión de CXCL10 en todos los grupos de lupus (con o sin LEC) en comparación con donantes sanos, pero este hallazgo fue mayor en las lesiones de los pacientes con LED. Por el contrario, la expresión de su receptor CXCR3 disminuyó en nuestro estudio.

Además, Freutel y cols (24), observaron un perfil de quimiocinas asociado a Th1. En su estudio, la proporción de células T cooperadoras CCR5/CCR3+ en pacientes con LEC se correlacionó con la actividad de la enfermedad; también demostraron que los pacientes con LEG y afectación cutánea tenían

niveles séricos más altos de CXCL16, en comparación con los pacientes con LEG sin LEC. Esta quimiocina es regulada por las citocinas Th1, incluidas IFN- γ , TNF- α e IL-18 (53).

Mientras tanto, las células Th17 producen IL-17 que estimula las células T, aumenta la producción de autoanticuerpos, citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-22) y quimiocinas (CCL2, CCL7, CCL20, CXCL1 y CXCL5) e induce el reclutamiento de neutrófilos a través de la regulación de las quimiocinas (54). Se ha descrito una expresión elevada de Th17 en la piel de pacientes con LEC (15, 55, 56). Aquí, la presencia de CCL2 y su receptor (CKR2A) también aumentó en todos los pacientes con lupus, independientemente de la presencia o no de manifestaciones cutáneas o el subtipo de LEC versus controles sanos. Y también observamos una mayor expresión de CCR6 (receptor CCL20) en el subgrupo de pacientes con lesiones de LED.

Por otro lado, se ha reconocido un mayor porcentaje de células Th22 en LEC en comparación con el tejido sano, así como una correlación negativa entre el tejido y el porcentaje de células Th22 periféricas con el puntaje CLASI. En línea con estos hallazgos, un estudio identificó que los pacientes con LEG con afectación cutánea también tenían frecuencias más altas de células CCR6+ y Th22. Además, la frecuencia de las células Th22 se correlacionó positivamente con la gravedad de la enfermedad y negativamente con los niveles séricos de C3 (57).

Las células B actúan como células presentadoras de antígeno y productoras de autoanticuerpos, y estas células se encuentran en la sangre periférica y en la piel lesionada de los pacientes con LED (58). CXCL13 es una quimiocina que atrae células B cuyo receptor es CXCR5, que normalmente se expresa en células B maduras y células T foliculares. En algunos estudios clínicos, los niveles séricos de esta quimiocina aumentaron en pacientes con LEG y se correlacionaron con la actividad de la enfermedad y con la nefritis lúpica (59, 60). Aquí observamos que la expresión de esta quimiocina fue mayor en piel sana y piel de pacientes con lupus sin afectación cutánea que en el grupo de pacientes con LEC. Sin embargo, su receptor CXCR5 se expresó altamente en el grupo LED.

Las células CD8+ citotóxicas también contribuyen al infiltrado inflamatorio que se encuentra en LEC. Un estudio que evaluó la expresión de CCR4 en los linfocitos T tanto en la piel como en la sangre periférica de pacientes con LEC sugirió que los pacientes con una mayor expresión en las células T CD8+ intralesionales y circulantes pertenecían a un subgrupo de pacientes con LEC con lesiones cicatriciales diseminadas (61).

Por otro lado, se ha descrito que el reclutamiento de basófilos a las lesiones cutáneas de pacientes con LEG está mediado por los receptores de quimiocinas CCR1 y CCR2 (62). Además, encontramos una mayor expresión de CXCL8 al comparar LED, LECS y LEG sin LEC en comparación con piel de controles sanos; siendo la máxima expresión en el grupo LED. Por el contrario, hubo alguna diferencia significativa en la expresión de CXCR1.

CXCL18 es un factor quimiotáctico principalmente de neutrófilos, pero también de otros granulocitos y fagocitos.

Finalmente, estudiamos CCL17 y su ligando CCR4 y no observamos ninguna diferencia entre todos los grupos. Sin embargo, se encontró una menor inmunorreactividad en los grupos de pacientes con lesiones de LED y de LECS en comparación con el grupo de lupus sin LEC y controles sanos. CCL17 y su ligando CCR4 y CCR8, se expresan en las células de Langerhans, las células endoteliales y los fibroblastos. La interacción entre CCL17 y CCR4 juega un papel crítico en la activación de macrófagos de tipo clásico (63).

Por otro lado también estudiamos un mecanismo de regulación epigenética en la fisiopatogenia de la enfermedad, actualmente dentro de los diferentes moduladores en el control de expresión de genes asociados a inmunidad e inflamación se encuentran los miRNAs que son determinantes clave en la regulación post-transcripcional del genoma (64-65). Es bien sabido que una respuesta inflamatoria inmune no controlada puede contribuir a la patogénesis de la autoinmunidad. En el presente trabajo, exploramos si la expresión de la firma de miRNA circulante podría identificar pacientes con LEC y sus variedades clínicas: LECS y LED, como lo describieron Sole et al. para miR-31 y miR-485-3p en LED en comparación con LECS (34). Nuestros hallazgos más relevantes fueron que miR-150, miR-1246, miR-21, miR-23b y miR-146 estaban regulados negativamente en el suero de pacientes con LECS en comparación con controles sanos. Además, la expresión de miR-1246, miR-

23b y miR-146, también fue regulada a la baja en pacientes con LED en comparación con pacientes con lesiones de LECS. Observamos algunas diferencias con respecto a la asociación de la expresión de subpoblaciones periféricas y tisulares y los miRNAs según las variedades de LEC. No obstante en el grupo de pacientes con LECS, miR-23b y miR1246 favorecieron una respuesta periférica Th2 y Th1; mientras que en el grupo de pacientes con LED, miR-1246 se asoció con infiltrados de células B productoras de IL-10.

miR-150 se expresa en diferentes linajes de células inmunes y participa en la maduración celular de linfocitos pro-B a pre-B, así como en el desarrollo y la actividad funcional de los linajes celulares NK e iNKT (66-67). Con respecto a la participación de miR-150 en la biología de la piel, se ha demostrado que su regulación negativa promueve la proliferación de queratinocitos en condiciones hipóxicas a través de la focalización de HIF-1 α y VEGF-A (68). Además, la regulación por disminución de miR-150 está asociada a la sobreexpresión constitutiva de colágeno tipo I en fibroblastos dérmicos de esclerodermia a través de la inducción de integrina β 3 (69). MiR-150 parece jugar un papel importante en la inducción de la proliferación de miofibroblastos y su resistencia a la apoptosis (67-69). Además, miR-150 también está regulado negativamente en otras enfermedades autoinmunes con afección de la piel, incluidas la psoriasis y las lesiones cutáneas de esclerosis sistémica cutánea difusa (SSc) (68). Específicamente, en SSc, la regulación negativa promueve la señalización de TGF- β y la fosforilación de Smad3, lo que resulta en la activación transcripcional del gen de colágeno tipo

I y la fibrosis tisular (68). En este sentido, un estudio describió que los pacientes con lesiones cutáneas de LED exhibían una firma distintiva de sobreexpresión de marcadores profibróticos, incluidos TGF- β y SMAD3 (34). Además, en línea con estos estudios, nuestros hallazgos sugieren que la regulación negativa de miR-150 en LEC podría influir en la activación de las vías inflamatorias y profibróticas crónicas.

Por otro lado, el papel de miR-1246 en la piel normal y los trastornos autoinmunes todavía está poco caracterizado. En pacientes con LEG, se encontró regulado a la baja. Esta baja expresión podría estar relacionada con el compromiso de hiperactivación de las células B. Curiosamente, las células B de pacientes con LEG no activo tienen niveles de expresión similares de miR-1246 en comparación con voluntarios sanos (39). Además, se ha demostrado que miR-1246 promueve la apoptosis inducida por UVB regulando negativamente la expresión de RTKN2 en los queratinocitos (70). Aquí, observamos que este miRNA también estaba regulado negativamente en pacientes con lesiones cutáneas de LECS y LED.

Con respecto a miR-146, se ha observado que las lesiones de melanoma lo sobreexpresan (71). En pacientes con psoriasis, miR-146a se correlaciona positivamente con la expresión de IL-17 en lesiones cutáneas y PBMC (72). Además, miR-146a regula la vía proinflamatoria TLR/MyD88 al estimular a IRAK1 y TRAF6 (73). MiR-146a también contribuye al desarrollo de LEG, debido a que es un regulador negativo de la vía IFN tipo I al estimular a IRF5, STAT1, IRAK1 y TRAF6 (74). Al igual que en pacientes con LEG, en este trabajo observamos una baja expresión en los pacientes con LEC. Por lo

tanto, la disminución de la expresión de miR-146a en PBMC podría contribuir a la producción mejorada de IFN tipo I (IFN- α/β) en lupus cutáneo.

MiR-23b, que es un marcador de diferenciación de los queratinocitos humanos (a través de la represión de TGIF1 y la activación de la vía de señalización de TGF- β -SMAD2), es regulado después de la irradiación UVA de los queratinocitos primarios humanos y actúa a través de atacar el oncogén viral RAS relacionado homólogo 2 (RRAS2), que se expresa fuertemente en el cáncer de piel maligno altamente agresivo (75, 76). Además, miR-23b promueve la cicatrización de heridas cutáneas mediante la inhibición de las respuestas inflamatorias dirigidas a ASK1 (77).

Asimismo, detectamos una baja expresión de miR-21, pero no de miR31, entre los pacientes con lesiones de LEC. miR-21, así como miR-31 son reguladores maestros de la activación de células T en LEG (78). Varios estudios han demostrado que la expresión aberrante de miR-21 está involucrada en la patogénesis de SSc y psoriasis. MiR-21 regula genes como SMAD3, SMAD7 y colágeno tipo I, todos implicados en la fibrosis (74). Además, se ha demostrado una regulación recíproca entre la hormona tiroidea y miR-21, donde miR21 regula a la baja la tumorigénesis de la piel impulsada por la vía hedgehog (carcinoma de células basales) (79). La sobreexpresión de miR-21 también inhibe el crecimiento y la metástasis de las células de melanoma al dirigirse a MKK3 (80).

En pacientes con LEG, miR-31 está regulado y asociado negativamente con la actividad de la enfermedad y la proteinuria, mientras que la alta expresión

de miR-21 se correlacionaba con el puntaje SLEDAI y la proteinuria. Además, una expresión reducida de miR-31 parece alterar la producción de IL-2 por las células T en pacientes con LEG, lo que puede influir en la expresión del factor nuclear de las células T activadas (NFAT) (81).

Por otro lado, un estudio reciente describió una firma de miRNA específica para LED que incluía a miR-31 y miR-485-3p. Demostró que la sobreexpresión de miR-31 es estimulada por UV y TGF- β y este miRNA activó la señalización de NF-kB estimulando respuestas proinflamatorias que producen infiltrados de neutrófilos y macrófagos en la piel (2). MiR-31 es un regulador clave para promover la proliferación y migración de queratinocitos durante la cicatrización de heridas (82), y se sobreexpresa en SSc, una enfermedad sistémica caracterizada por fibrosis extensa (83, 84).

Finalmente, la participación de algunas vías de respuesta inmune, incluida la señalización PRR, el transductor de señal JAK, la señalización STAT, la señalización NF-kB y la cascada de señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) se ha descrito en el LEC (74). En el presente estudio, se vincularon varias rutas con los miRNAs circulantes expresados diferencialmente en LEC. El análisis de la red de interactomas reveló una fuerte conexión entre los miRNAs circulantes en los grupos con lesiones de LECS y LED con una conexión particularmente sólida, como las vías de regulación del ciclo celular, la señalización de p53, la señalización de TGF- β , la señalización de NF-kB, la ruta de HIF-1, la señalización de la hormona tiroidea y vías de cáncer, entre otros. Algunos de ellos, como se mencionó

anteriormente, se describieron en LEC, pero otros no, lo que abrió nuevas áreas de investigación. En general, los nuevos conocimientos sobre la patogénesis de LEC podrían permitir el desarrollo de tratamientos novedosos, como la inhibición de estas vías inmunes.

Ciertamente, reconocemos que nuestro estudio tiene las siguientes limitaciones: primero, un tamaño de muestra limitado y la falta de una cohorte de replicación. No obstante, nuestra muestra fue cuidadosamente seleccionada clínicamente y pudo detectar diferencias en la expresión de miRNAs entre los diferentes grupos de pacientes con lupus cutáneo: LED y LECS. En segundo lugar, no evaluamos la presencia de miRNAs en las biopsias de piel. Sin embargo, estábamos interesados en estudiar los miRNAs circulantes con el fin de utilizarlos como futuros biomarcadores potenciales basados en sangre para evaluar las recaídas y la respuesta al tratamiento, sin la necesidad de realizar biopsias. Finalmente, en el análisis de las subpoblaciones periféricas y de la piel, ninguno de los miRNA circulantes regulados negativamente se asoció con células Th17 y Th22 previamente reconocidas como participantes en la patogénesis LEC. Por lo tanto, es muy probable que otros miRNAs también estén implicados en la regulación de estas subpoblaciones celulares. Además de estas limitaciones, consideramos que nuestro manuscrito actual es relevante particularmente por la escasa información con respecto a la patogénesis de LEC.

IX. CONCLUSIONES:

=

En conclusión, en el tejido de pacientes con LEC observamos la participación de CXCL8, CXCL10, CCL2, CKR2A, CCL27, CCR10, CXCL13, CXCR5, CXCL8 y CCR6. Sin embargo, la inmunoreactividad de CXCL10, CCL27, CXCL8 y CCR6 predominó en el grupo de pacientes con LED. Mientras que de manera sérica, determinamos la regulación negativa de miR-150, miR-1246 y miR-21 en pacientes con LEC. En los pacientes con la variedad clínica de LECS tuvieron niveles más bajos de miR-1246, miR-146 y miR-23b. En general, estos miRNAs se relacionaron con la presencia de diferentes subpoblaciones periféricas y cutáneas y participaron en diversas vías. Sin embargo, se necesita más investigación para validar nuestros resultados en otras poblaciones y evaluar el papel de estos miRNAs como biomarcadores clínicos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

-

1. Di Battista M, Marcucci E, Elefante E, Tripoli A, Governato G, Zucchi D, et al. One year in review 2018: systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36(5):763-777.
2. Heinlen LD, McClain MT, Merrill J, Akbarali YW, Edgerton CC, Harley JB, et al. Clinical criteria for systemic lupus erythematosus precede diagnosis, and associated autoantibodies are present before clinical symptoms. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2344–51.
3. 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.
4. Ogunsanya ME, Nduaguba SO, Brown CM. Incremental health care services and expenditures associated with depression among individuals with cutaneous lupus erythematosus (CLE). *Lupus*. 2018;27(7):1107-1115.
5. Gilliam, J. The cutaneous signs of lupus erythematosus. *Cont Educ Fam Phys*. 1977; 6: 34–70.
6. 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.
7. Kuhn A, Landmann A. The classification and diagnosis of cutaneous lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 2014;48-49:14-9.

8. 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.
9. Hersh AO, Arkin LM, Prahalad S. *Immunogenetics of cutaneous lupus erythematosus. Curr Opin Pediatr.* 2016;28(4):470-5.
10. Walling HW, Sontheimer RD. Cutaneous lupus erythematosus: issues in diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol.* 2009;10(6):365-81.
11. 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.
12. Nümborg W, Haas N, Scahdendorf D, Czarnetzki B. Interleukin-6 expression in the skin of patients with lupus erythematosus. *Exp Dermatol* 1995; 4:52-7.
13. Stein L, Saed G, Fivenson D. T cell cytokine network in cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36:191-6.
14. 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
15. Méndez-Flores S, Hernández-Molina G, Enríquez AB, Faz-Muñoz D, Esquivel Y, Pacheco-Molina C, Furuzawa-Carballeda J. Cytokines and Effector/Regulatory Cells Characterization in the Physiopathology of Cutaneous Lupus Erythematosus: A Cross-Sectional Study. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:7074829.

16. Baltaci M, Fritsch P. Histologic features of cutaneous lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2009 8(6):467-73
17. Legler DF, Thelen M. Chemokines: Chemistry, Biochemistry and Biological Function. *Chimia (Aarau)*. 2016;70(12):856-859.
18. Sharma M. Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. *Crit Rev Biotechnol* 2010;30:1-22.
19. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:217-42.
20. Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein* 2015;13(3):469-73.
21. Fantuzzi L, Tagliamonte M, Gauzzi MC, Lopalco L. Dual CCR5/CCR2 targeting: opportunities for the cure of complex disorders. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(24):4869-4886.
22. Yoshie O, Matsushima K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *Int Immunol*. 2015;27(1):11-20.
23. Gambichler T, Genc Z, Skrygan M, Scola N, Tigges C, Terras S. Cytokine and chemokine ligand expression in cutaneous lupus erythematosus. *Eur J Dermatol* 2012; 22:319-23
24. 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; 20(12):1300-4
25. Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis*. 2015;35(1):3-11.

26. Zendjabil M, Favard S, Tse C, Abbou O, Hainque B. The microRNAs as biomarkers: What prospects? *C R Biol.* 2017;340(2):114-131.
27. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res* 2011; 157 (4): 163-79.
28. Gracias DT, Katsikis PD. MicroRNAs: key components of immune regulation. *Adv Exp Med Biol.* 2011; 780:15-26.
29. Zhang B, Wang Q, Pan X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J Cell Physiol.* 2007; 210 (2): 279-89
30. Steen SO, Iversen LV, Carlsen AL, Burton M, Nielsen CT, Jacobsen S, et al. The circulating cell-free microRNA profile in systemic sclerosis is distinct from both healthy controls and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2015; 42 (2): 214-21.
31. Wang G, Tam LS, Li EK, Kwan BC, Chow KM, Luk CC, et al. Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2011; 20 (5):493-500.
32. Dai Y, Huang YS, Tang M, Lv TY, Hu CX, Tan YH, et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* 2007; 16 (12):939-46
33. Steen SO, Iversen LV, Carlsen AL, Burton M, Nielsen CT, Jacobsen S, et al. The circulating cell-free microRNA profile in systemic sclerosis is distinct from both healthy controls and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2015; 42 (2): 214-21.

34. Solé C, Domingo S, Ferrer B, Moliné T, Ordi-Ros J, Cortés-Hernández J. MicroRNA Expression Profiling Identifies miR-31 and miR-485-3p as Regulators in the Pathogenesis of Discoid Cutaneous Lupus. *J Invest Dermatol* 2019; 139 (1): 51-61.
35. Wang X, Zhang C, Wu Z, Chen Y, Shi W. CirclBTK inhibits DNA demethylation and activation of AKT signaling pathway via miR-29b in peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2018; 20(1): 118.
36. Liston A, Papadopoulou AS, Danso-Abeam D, Dooley J. MicroRNA-29 in the adaptive immune system: setting the threshold. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69(21):3533-41.
37. Tan LP, Wang M, Robertus JL, Schakel RN, Gibcus JH, Diepstra A, et al. miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes. *Lab Invest* 2009; 89(6):708-16.
38. Zhu S, Pan W, Song X, Liu Y, Shao X, Tang Y, et al. The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK- α . *Nat Med* 2012; 18(7):1077-86.
39. Luo S, Liu Y, Liang G, Zhao M, Wu H, Liang Y, et al. The role of microRNA-1246 in the regulation of B cell activation and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Epigenetics* 2015; 7:24.

40. Lu TX, Hartner J, Lim EJ, Fabry V, Mingler MK, Cole ET, et al. MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 2011; 187(6): 3362-73.
41. Stepicheva NA, Song JL. Function and regulation of microRNA-31 in development and disease. *Mol Reprod Dev* 2016; 83(8):654-74.
42. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol* 2008; 180:5689–5698.
43. Fu HX, Fan XP, Li M, Liu MJ, Sun QL. MiR-146a relieves kidney injury in mice with systemic lupus erythematosus through regulating NF-kB pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019; 23(16): 7024-7032.
44. Zhang J, Cheng Y, Cui W, Li M, Li B, Guo L. MicroRNA-155 modulates Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2014; 266(1-2):56-63.
45. Lerman G, Sharon M, Leibowitz-Amit R, Sidi Y, Avni D. The crosstalk between IL-22 signaling and miR-197 in human keratinocytes. *PLoS One* 2014; 9(9):e107467.

46. Achtman J, Werth W. Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Res Therapy* 2015; 17:182.
47. Meller S, Winterberg F, Gilliet M, et al. Ultraviolet radiation induced injury, chemokines and leukocyte recruitment: an amplification cycle triggering cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1504-16.
48. Morales J, Homey B, Vicari A, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, et al. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96:14470-5.
49. Wenzel J, Proelss J, Wiechert A, Zahn S, Bieber T, Tüting T. CXCR2-mediated recruitment of cytotoxic lymphocytes in lupus erythematosus profundus. *J Am Acad Dermatol* 2007, 56:648.50.
50. Cole K, Strick C, Pradis T, Oghame K, Loestscher M, Gladue R, et al. Interferon inducible T cell alpha chemoattractant: a novel non-ELF CXC chemokine with potent activity on activated T cell through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 1998; 187:2009-21.
51. Flier J, Boorsma D, van Beek P, et al. The expression pattern of interferon-inducible proteins reflects the characteristic histological distribution of infiltration immune cells in different cutaneous lupus erythematosus subsets. *J Pathol* 2001;194:398-405.

52. Heller E, Tager A, Yuan Q, Lin A, Ahluwalia, et al. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation* 2006; 113:2301-12.
53. Qin M, Guo Y, Jiang L, Wang X. Elevated levels of serum sCXCL16 in systemic lupus erythematosus; potential involvement in cutaneous and renal manifestations. *Clin Rheumatol* 2014; 33:1595-1601.
54. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun.* 2008; 31(3):252–6.
55. Tanasescu C, Balancescu E, Balanescu P, Olteanu R, Badea C, Grancea C, et al. IL-17 in cutaneous lupus erythematosus. *Eur J Intern Med* 2010; 21(3): 202-7.
56. Mikita N, Ikeda T, Ishiguro M, Furukawa F. Recent advances in cytokines in cutaneous and systemic lupus erythematosus. *J Dermatol.* 2011; 38(9):839-49.
57. Zhong W, Jiang Y, Ma H, Wu J, Jiang Z, Zhao L. Elevated levels of CCR6+T helper 22 cells correlates with skin and renal impairment in systemic lupus erythematosus. *Scientific Reports* 2017;7,12962.
58. Wouters C, Diegenant C, Ceuppens J, Degreef H, Stevens E. The circulating lymphocytes profiles in patients with discoid lupus erythematosus and systemic lupus erythematosus suggest a pathogenetic relationship. *Br J Dermatol* 2004;150: 693-700.

59. Schiffer L, Worthmann K, Haller H, Schiffer M. CXCL13 as a new biomarker of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis-from bench to bedside? *Clin Exp Immunol* 2014;179:85-89.
60. Wong C, Wong P, Tam L, Li E, Chen D, et al. Elevated production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *Clin Exp Immunol* 2010; 30:45-52.
61. Wenzel J, Henze S, Wörenkämper E, Basner-Tschakarjan E, Sokolowska-Wojdilo S, Steitz J, et al. Role of chemokine receptor CCR4 and its ligand thymus- and activation-regulated chemokine/CCL17 for lymphocyte recruitment in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 2005; 124:1241-48.
62. Pan Q, Feng Y, Peng Y, Zhou H, Deng Z, Li L, et al. Basophil recruitment to skin lesions of patients with systemic lupus erythematosus mediated by CCR1 and CCR2. *Cell Physiol Biochem* 2017;43:832-39
63. Inngjerdingen M., Damaj B., Maghazachi A. A. Human NK cells express CC chemokine receptors 4 and 8 and respond to thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine, and I-309. *J Immunol*. 2000;164(8):4048–4054
64. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75 (5): 843-54.

65. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993; 75 (5): 855-62.
66. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 control B cell differentiation by targeting the transcription factor *c-Myb*. *Cell*. 2007;131 (1): 146-59.
67. Bezman NA, Chakraborty T, Bender T, Lanier LL. miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. *J Exp Med*. 2011; 208 (13): 2717-31
68. Li Y, Su J, Li F, Chen X, Zhang G. MiR-150 regulates human keratinocyte proliferation in hypoxic conditions through targeting HIF-1 α and VEGFA: Implications for psoriasis treatment. *PLoS One*. 2017; 12(4):e0175459.
69. Honda N, Jinnin M, Kira-Etoh T, Makino K, Kajihara I, Makino T, et al. miR-150 down-regulation contributes to the constitutive type I collagen overexpression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin β 3. *Am J Pathol*. 2013; 182 (1):206-16.
70. Li W, Wu YF, Xu RH, Lu H, Hu C, Quian H. miR-1246 releases RTKN2-dependent resistance to UVB-induced apoptosis in HaCaT cells. *Mol Cell Biochem*. 2014; 394(1-2):299-306.

71. Aksenenko M, Palkina N, Komina A, Tashireva L, Ruksha T. Differences in microRNA expression between melanoma and healthy adjacent skin. *BMC Dermatol* . 2019; 19(1):1.
72. Xia P, Fang X, Zhang ZH, Huang Q, Yan KX, Kang KF, et al. Dysregulation of miRNA146a versus IRAK1 induces IL-17 persistence in the psoriatic skin lesions. *Immunol Lett*. 2012; 148(2):151-62.
73. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(33): 12481-6.
74. Chen JQ, Papp G, Szodoray P, Zeher M. The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2016; 15 (12):1171-1180.
75. Barbolat-Boutrand L, Joly-Tonetti N, Dos Santos M, Metral E, Boher A, Masse I, et al. MicroRNA-23b-3p regulates human keratinocyte differentiation through repression of TGIF1 and activation of the TGF- β -SMAD2 signalling pathway. *Exp Dermatol*. 2017; 26(1):51-57.
76. Kraemer A, Chen I-P, Henning S, Faust A, Volkmer B, Atkinson MJ, et al. UVA and UVB irradiation differentially regulate microRNA expression in human primary keratinocytes. *PLoS One*. (2013); 8 (12): e83392.
77. Li H, Han X, Zuo K, Li L, Liu J, Yuan X, et al. miR-23b promotes cutaneous wound healing through inhibition of the inflammatory

- responses by targeting ASK1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2018; 50(11): 1104-1113.
78. Amr KS, Bayoumi FS, Elgengehy FT, Abdallah SO, Ahmed HH, Eissa E. The role of microRNA-31 and microRNA-21 as regulatory biomarkers in the activation of T lymphocytes of Egyptian lupus patients. *Rheumatol Int*. 2016; 36 (11):1617-25.
79. Di Girolamo D, Ambrosio R, De Stefano MA, Mancino G, Porcelli T, Luongo C, et al. Reciprocal interplay between thyroid hormone and microRNA-21 regulates hedgehog pathway-driven skin tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2016; 126(6): 2308-20.
80. Zhuo M, Yu X, Jing Z, Wu W, Lu C. Overexpression of microRNA-21 inhibits the growth and metastasis of melanoma cells by targeting MKK3. *Mol Med Rep* 2019; 20(2):1797-1807.
81. Fan W, Liang D, Tang Y, Qu B, Cui H, Luo X, et al. Identification of microRNA-31 as a novel regulator contributing to impaired interleukin-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012; 64 (11):3715-25.
82. Li D, Li XI, Wang A, Meisgen F, Pivarcsi A, Sonkoly E, et al. MicroRNA-31 Promotes Skin Wound Healing by Enhancing Keratinocyte Proliferation and Migration. *J Invest Dermatol* 2015; 135(6): 1676-1685.

83. Zhou B, Zuo XX, Li YS, Gao SM, Dai XD, Zhu HL, et al. Integration of microRNA and mRNA expression profiles in the skin of systemic sclerosis patients. *Sci Rep* 2017; 7:42899.
84. Zhu H, Li Y, Qu S, Luo H, Zhou Y, Wang Y, et al. MicroRNA expression abnormalities in limited cutaneous scleroderma and diffuse cutaneous scleroderma. *J Clin Immunol* 2012; 32(3):514-22.

1. XI. ANEXO 1: CLASI (Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index)

Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index (CLASI)

ACTIVIDAD			DAÑO		
LOCALIZACION	ERITEMA	ESCAMA/ HIPERTROFIA	DESPIGMENTACION	COSTRA/ ATROFIA/ PANICULITIS	LOCALIZACION
	0: ausente 1: rosa/ligero 2: Rojo 3: Rojo intenso; purpura Violáceo/ hemorrágico	0: ausente 1: escama 2: verrucosa/ hipertrofica	0: Ausente 1: Presente	0: Ausente 1: costra o cicatriz 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/glúteos					Espalda/glúteos
Brazos					Brazos
Manos					Manos
Piernas					Piernas
Pies					Pies

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

ALOPECIA		ALOPECIA CICATRIZAL	
RESIENTE PERDIDA DE CABELLO (dentro de los últimos 30 días) 0: NO 1: SI			
ALOPECIA CLINICAMNETE NO 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. Correlaciones entre subpoblaciones tisulares y miRNAs circulantes.

	miRNA - 150			miRNA - 23b			miRNA - 1246			miRNA - 21			miRNA - 31			miRNA - 146		
	LECS	LED	Sanos	LECS	LED	Sanos	LECS	LED	Sanos	LECS	LED	Sanos	LECS	LED	Sanos	LECS	LED	Sanos
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD161 ⁺ /IL-22 ⁺ cells (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD161 ⁺ /IL-17A ⁺ cells (%)	NS	NS	NS	-0.587	NS	NS	-0.699	NS	NS	-0.593	NS	NS	-0.631	NS	NS	-0.556	NS	NS
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ⁺ /IL-4 ⁺ cells (%)	NS	NS	-0.719	NS	NS	-0.468	NS	NS	-0.599	NS	NS	NS	NS	NS	-0.738	NS	NS	NS
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ⁺ /IFN-g ⁺ cells (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.512	-0.446	NS	NS	-0.529	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ^{hi} /Foxp3 ⁺ cells (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD19 ⁺ /CD24 ^{hi} /CD38 ^{hi} /IL-10 ⁺ cells (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.505	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD123 ^{hi} /CD196 ⁺ /IDO ⁺ cells (%)	NS	NS	0.653	NS	NS	0.593	NS	NS	0.643	NS	NS	NS	NS	NS	0.615	NS	NS	0.577

LECS: Lupus cutáneo subagudo; **LED:** Lupus cutáneo Discoide

Anexo 3. Correlación entre subpoblaciones celulares circulantes y miRNAs circulantes

	miRNA - 150			miRNA - 23b			miRNA - 1246			miRNA - 21			miRNA - 31			miRNA - 146		
	LECS	LED	Sanos	LECS	LED	Sanos	LECS	LED	Sanos	LECS	LED	Sanos	LECS	LED	Sanos	LECS	LED	Sanos
IL-22-expressing cells (%) (<i>Epidermis</i>)	NS	NS	-0.496	0.726	NS	-0.519	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.470	NS	NS	NS	NS	-0.609
IL-22-expressing cells (%) (<i>Dermis</i>)	0.468	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.476	NS	NS	NS	NS	NS
IL-17A-expressing CD4+ cells (%) (<i>Epidermis</i>)	NS	NS	NS	-0.668	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IL-17A-expressing CD4+ cells (%) (<i>Dermis</i>)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IL-4-expressing CD4+ cells (%) (<i>Epidermis</i>)	NS	NS	NS	0.533	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.462	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IL-4-expressing CD4+ cells (%) (<i>Dermis</i>)	NS	0.741	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IFN- γ -expressing CD4+ cells (%) (<i>Epidermis</i>)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IFN- γ -expressing CD4+ cells (%) (<i>Dermis</i>)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.519	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Foxp3-expressing CD25+ cells (%) (<i>Epidermis</i>)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.500	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.475
Foxp3-expressing CD25+ cells (%) (<i>Dermis</i>)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IL-10-expressing CD20+ cells (%) (<i>Epidermis</i>)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.576	NS	NS	0.496	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IL-10-expressing CD20+ cells (%) (<i>Dermis</i>)	NS	NS	NS	0.527	NS	NS	NS	NS	NS	0.682	NS	NS	0.597	NS	NS	0.456	NS	NS
IDO-expressing CD123+ cells (%) (<i>Epidermis</i>)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IDO-expressing CD123+ cells (%) (<i>Dermis</i>)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.568	NS	NS	NS	NS	0.545	NS	NS	NS	NS	NS

LECS: Lupus cutáneo subagudo; **LED:** Lupus cutáneo Discoide

Artículos Publicados Relacionados al Trabajo de Tesis:

**EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA INFLAMACIÓN
EN LA FISIOPATOGENIA DEL LUPUS ERITEMATOSO CUTÁNEO**

Alumna:

DRA. SILVIA MÉNDEZ FLORES

Tutores:

DRA. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA

DRA. GABRIELA HERNÁNDEZ MOLINA



Inflammatory chemokine profiles and their correlations with effector CD4 T cell and regulatory cell subpopulations in cutaneous lupus erythematosus

Silvia Méndez-Flores^a, Gabriela Hernández-Molina^{b,*}, Daniel Azamar-Llamas^b, Joaquín Zúñiga^{c,d}, Juanita Romero-Díaz^b, Janette Furuzawa-Carballeda^{b,*}

^a Department of Dermatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, 14080 Mexico City, Mexico

^b Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, 14080 Mexico City, Mexico

^c Laboratory of Immunobiology and Genetics, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

^d School of Medicine and Health Sciences, Tecnológico de Monterrey, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Chemokines
Cutaneous lupus
Discoid lupus
Subacute cutaneous lupus

ABSTRACT

We compared the chemokine/receptor expression in skin biopsies of discoid (SLE/DLE) and subacute lupus (SLE/SCLE) and correlated it with tissue and circulating effector CD4 T cells/regulatory cells. Skin biopsies and peripheral blood from 9 active SLE/DLE patients, 9 SLE/SCLE patients, 5 control SLE patients without cutaneous lesions and 10 control healthy donors were included. Clinical skin activity was measured by Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index scoring, and systemic activity was measured by a modified SLEDAI-2K excluding the cutaneous items. Pain and pruritus were evaluated by a 10-point visual analogue scale. To determine the frequencies of CXCL10/CXCR3-, CCL2/CCR2-, CCL17/CCR4-, CCL20/CCR6-, CCL27/CCR10-, CXCL8/CXCR1-, CXCL13/CXCR5-, IL-22-, CD4/IL-17A-, CD4/IL-4-, CD4/IFN- γ -, CD123/IDO-, CD25/Foxp3-, and CD20/IL-10-expressing cells, double immunostaining procedures were performed. Circulating CD4+/CD161-/IL-22+, CD4+/CD161+/IL-17+, CD4+/CD25-/IL-4+, CD4+/CD25-/IFN- γ +, CD4+/CD25hi/Foxp3+, CD3+/CD19+/CD38hi/IL-10+, and CD123+/CD196+/IDO+ cells were analyzed by flow cytometry.

Results: In the tissue, CXCL10, CXCR5, and CCL20 expression and IL-22+, CD4+/IL-17+, CD4+/IFN- γ + and CD123+/IDO+ cell percentages were increased in SLE/DLE versus SLE/SCLE. Circulating CD4+/CD161-/IL-22+, CD4+/CD161+/IL-17+, CD4+/CD25-/IFN- γ +, CD19+/CD38hi/IL-10+ and CD123+/CD196+/IDO+ cell percentages were higher in SLE/DLE versus SLE/SCLE. In the tissue, we found positive correlations between CXCR3 and CD4+/IL-17+ cells; CCR2 and CD4+/IFN- γ + cells; and CCR10 and CD123+/IDO+ cells in the SLE/DLE patients and between CXCL13 and CD20+/IL-10+ cells in the SLE/SCLE patients. In the peripheral blood, we determined positive correlations between CXCR5 and CD4+/CD25-/IFN- γ + cells; CCL17 and CD4+/CD161-/IL-22+ cells; and CCL17 and CD4+/CD161+/IL-17+ cells in the SLE/DLE patients and between CXCR5 and CD3+/CD19+/CD38hi/IL-10+ cells; CCR2 and CD4+/CD25hi/Foxp3+ cells; and CXCR1 and CD4+/CD25hi/Foxp3+ cells in the SLE/SCLE patients. Positive correlations between the pain score and the expression of CCL2 and CCR6 expression were found in the SLE/SCLE patients.

In conclusion, the correlations between the expression of chemokines/receptors and subpopulations of effector/regulatory cells showed differential responses among the cutaneous pathologies.

1. Introduction

Cutaneous lupus erythematosus (CLE) is an inflammatory disease that encompasses diverse clinical features. Its pathogenesis is complex, multifactorial and still not defined. Although there is a broad spectrum

of histological subsets, the overall histological finding in CLE is characterized by moderately dense to dense perivascular and peri-appendageal lymphocytic infiltrates in the papillary and reticular dermis with abundant mucin deposition in the reticular dermis [1].

The cell infiltration of the skin may be explained by the presence of

* Corresponding authors.

E-mail addresses: gabyhm@yahoo.com (G. Hernández-Molina), jfuruzawa@gmail.com (J. Furuzawa-Carballeda).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.03.010>

Received 10 November 2018; Received in revised form 8 March 2019; Accepted 14 March 2019

Available online 20 March 2019

1043-4666/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Demographic and clinical characteristics from patients with cutaneous lupus erythematosus.

	HD (n = 10)	SLE w/o CD (n = 5)	SLE/DLE (n = 9)	SLE/SCLE (n = 9)	P value
Demographics					
<i>Age (years)</i>					
Mean ± SD	40.0 ± 15.6	44.8 ± 16.4	30.9 ± 9.7	35.3 ± 13.1	
Median	42.0	44.0	29.0	34.0	
Range	(21 – 62)	(28 – 70)	(20 – 47)	(18 – 56)	
<i>Sex</i>					
(Female %)	90.0	80.0	100.0	88.9	
<i>Disease duration (years)</i>					
Mean ± SD	–	11.0 ± 6.8	7.7 ± 5.0	9.0 ± 8.5	
Median		11.0	9.0	5.0	
Range		(8 – 25)	(1 – 15)	(2 – 25)	
Laboratory variables					
<i>Hemoglobin (g/dl)</i>					
Mean ± SD	13.8 ± 2.0	13.9 ± 1.2	12.8 ± 1.3	12.3 ± 2.5	
Median	14.4	14.2	13.3	12.9	
Range	(11.0 – 15.5)	(12.7 – 15.6)	(10.5 – 14.5)	(8.6 – 15.1)	
<i>Leucocytes (cells/μl)</i>					
Mean ± SD	6050.0 ± 1720.2	6560.0 ± 2067.1	6700.0 ± 2241.7	6037.5 ± 2446.5	
Median	6100.0	6800.0	6100.0	6050.0	
Range	(4400 – 9100)	(4500 – 9400)	(4500 – 10900)	(1200 – 9500)	
<i>Lymphocytes (%)</i>					
Mean ± SD	30.9 ± 11.4	20.1 ± 6.7	23.2 ± 8.8	20.8 ± 10.9	
Median	28.8	17.0	21.5	19.5	
Range	(17.9 – 52.1)	(14.4 – 30.8)	(11.7 – 38.9)	(3.2 – 38.0)	
<i>Monocytes (%)</i>					
Mean ± SD	9.4 ± 2.2	6.4 ± 1.3	6.1 ± 2.3	6.2 ± 3.3	
Median	8.9	7.0	6.6	4.2	
Range	(6.6 – 13.2)	(4.6 – 7.5)	(3.4 – 10.0)	(2.4 – 10.0)	
<i>Neutrophils (%)</i>					
Mean ± SD	66.2 ± 17.1	72.2 ± 12.2	74.0 ± 6.1	71.8 ± 9.9	
Median	62.3	73.5	74.6	72.2	
Range	(50.0 – 90.2)	(52.5 – 84.6)	(63.2 – 81.0)	(54.9 – 90.0)	
<i>Platelets (cells/μl)</i>					
Mean ± SD	257,500.0 ± 24,501.7	225,400.0 ± 61,877.3	213,000.0 ± 83,479.0	207,000.0 ± 80,624.3	
Median	257,000.0	196,000.0	211,000.0	230,000.0	
Range	(234,000 – 282,000)	(168,000 – 308,000)	(99,000 – 355,000)	(45,000 – 278,000)	
<i>Anti-dDNA (UI/ml)</i>					
Mean ± SD	–	205.1 ± 119.6	237.1 ± 358.0	228.0 ± 324.5	
Median		238.9	96.7	94.7	
Range		(12 – 326)	(4 – 1055)	(7 – 957)	
<i>C3 (UI/ml)</i>					
Mean ± SD	–	95.2 ± 28.2	77.1 ± 23.9	76.7 ± 31.1	
Median		86.0	75.4	74.0	
Range		(69 – 139)	(45 – 111)	(42 – 127)	
<i>C4 (UI/ml)</i>					
Mean ± SD	–	13.4 ± 7.9	11.0 ± 4.4	15.2 ± 15.5	
Median		8.0	9.8	8.0	
Range		(7 – 23)	(7 – 19)	(6 – 54)	
<i>ESR (mmHg)</i>					
Mean ± SD	–	29.3 ± 27.8	32.5 ± 18.3	33.6 ± 19.4	
Median		22.5	25.0	36.0	
Range		(4 – 68)	(6 – 70)	(6 – 62)	
Clinical Variables					
<i>CLASI activity score</i>					
Mean ± SD	–	–	15.8 ± 6.8	21.9 ± 6.4	f [†]
Median			13.0	23.0	
Range			(8 – 29)	(14 – 35)	
Treatment					
<i>Prednisone (mg/day)</i>					
Mean ± SD	–	27.5	12.8 ± 9	25.28 ± 15	b ^{††} , f ^{†††}
Median		27.5	11.25	30	
Range		(5–50)	(5–30)	(5–50)	
Prednisone (%)	–	40	88	100	
Antimalarial (%)	–	40	44	44	
DMARDs (%)	–	60	89	44	

(continued on next page)

Table 1 (continued)

	HD (n = 10)	SLE w/o CD (n = 5)	SLE/DLE (n = 9)	SLE/SCLE (n = 9)	P value
Cyclophosphamide (%)	–	20	11	11	

HD: healthy donors; SLE w/o CD: systemic lupus erythematosus without cutaneous disease; SLE/DLE: discoid lupus erythematosus; SLE/SCLE: subacute cutaneous lupus erythematosus. ^aHD versus SLE w/o CD; ^bHD versus SLE/DLE; ^cHD versus SLE/SCLE; ^dSLE w/o CD versus SLE/DLE; ^eSLE w/o CD versus SLE/SCLE; ^fSLE/DLE versus SLE/SCLE.

* $P \leq 0.05$.

** $P \leq 0.001$.

certain chemokine receptor and ligand interactions. Chemokines are a large family of chemotactic cytokines that participate in immune and inflammatory responses through the chemoattraction and activation of leukocytes. They are produced by a wide variety of cell types of both hematopoietic and nonhematopoietic origins and play key roles in the migration and activation of leukocytes *in vivo*. In addition, they are implicated in the modulation of other biological functions, including cell adhesion, phagocytosis, cytokine secretion, T cell activation, apoptosis, angiogenesis, proliferation and viral pathogenesis [2].

Nevertheless, the participation of chemokines in CLE has scarcely been evaluated, and studies have mainly focused on the Th1 response. For instance, increased mRNA expression of CXCL9 and CXCL10 in patients with discoid lupus (DLE), subacute lupus (SCLE) or lupus tumidus has been described [3]. In another study, patients with widespread active CLE skin lesions had significantly increased expression of CCR5 in peripheral blood mononuclear cells, whereas the expression of CCR3 in the patients was decreased when compared with that in healthy controls [4].

This study was undertaken to assess chemokines and their receptor profiles in DLE and SCLE and to correlate the disease activity CLASI score with chemokines/receptors and chemokines/receptors with CD4 T cells/regulatory cells in the skin and periphery.

2. Materials and methods

2.1. Patients

This study was a cross-sectional study conducted in a tertiary care center between February 2015 and December 2016. We included patients with cutaneous lupus in the DLE and SCLE subsets. To be eligible, patients had to meet the ACR classification criteria for systemic lupus erythematosus (SLE) [5] and have an active lupus-specific lesion compatible with DLE or SCLE. The diagnosis of CLE was established by consensus by a rheumatologist and a dermatologist and was also biopsy proven. In addition, patients should not receive any topical treatment, including steroids, other than emollients within the last 4 weeks. However, patients could maintain their basic systemic treatment, such as oral steroids or immunosuppressors. Patients were excluded if they had any concomitant cutaneous lesion not attributed to lupus or had an overlapping autoimmune condition.

As controls, we included patients with SLE without cutaneous lesions (SLE w/o CD) (who may or may not have received steroids or immunosuppressors) and healthy donors (HD) matched by age \pm 5 years. The healthy controls did not have any autoimmune diseases or concurrent infections and did not receive prednisone or immunosuppressive therapy.

Clinical skin activity was measured by the Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index (CLASI), a validated index to quantify disease severity [6]. As this index measures both activity and damage, for the present study, we only used the activity domain that ranges from 0 to 70 (higher scores are indicative of more severe disease). We also scored a modified SLEDAI-2K that excluded the cutaneous items to assess systemic activity [7]. Pain and pruritus were evaluated by means of 10-point Visual Analogue Scales (VAS).

In addition, patients' clinical records were carefully reviewed

according to a preestablished protocol to retrospectively collect demographic data as well as clinical and serological features.

2.2. Tissue samples and blood samples

Skin punch biopsies (4 mm diameter) were performed, and the tissue samples were fixed in formalin and evaluated with hematoxylin-eosin staining for the presence of classic histological CLE features. Then, the rest of each specimen was stored for immunohistochemistry. Microscopic review for diagnosis was conducted in a blinded manner by two independent observers (DALI and JFC). Overall, most of the CLE biopsies corresponded to photoexposed areas localized in the thorax, arms or scalp. Control tissue biopsies were also taken from photoexposed areas and, when possible, from the same anatomical region.

In addition, fifteen milliliters of venous blood from each subject was obtained by venipuncture in tubes with EDTA.

2.3. Standard laboratory assessments

Evaluations included blood chemistry, anti-double stranded DNA (ds-DNA) antibody levels determined by ELISA, and C3 and C4 levels quantified by ELISA.

2.4. Immunohistochemistry for chemokines

To identify chemokine- and receptor-expressing cells, 4- μ m-thick sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue were placed on positively charged slides. The sections were deparaffinized with xylene and rehydrated with a graded series of ethanol and water washes before staining. Following standard dewaxing and rehydration, enzyme antigen retrieval was performed (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA). The tissue samples were blocked with a peroxidase solution. Then, nonspecific background staining was prevented with an IHC background blocker (Enzo Life Sciences). To determine the subpopulations of CXCL10+/CXCR3+ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA/Abcam, Cambridge, UK), CCL2+/CCR2+ (Santa Cruz Biotechnology), CCL17+/CCR4+ (Abcam/Santa Cruz Biotechnology), CCL20+/CCR6+ (Santa Cruz Biotechnology), CCL27+/CCR10+ (Santa Cruz Biotechnology/Abcam), CXCL8+/CXCR1+ (Santa Cruz Biotechnology/Abcam) and CXCL13+/CXCR5+ (Abcam) cells, simultaneous detection was performed (MultiView (mouse-HRP/rabbit-AP) Enzo Life Sciences). The procedure was a sequential double-staining procedure in which the IHC universal negative control reagent, used as a negative control (Enzo Life Sciences), and 10 μ g/mL mouse monoclonal/rabbit polyclonal antibodies were incubated for 30 min at room temperature. The slides were washed and then incubated with the appropriate PolyView IHC reagent (mouse-HRP and rabbit-AP) for 20 min. Finally, antigens were visualized using horseradish peroxidase (HRP)/3,3'-diaminobenzidine (DAB), and the second antigen was visualized with alkaline phosphatase (AP)/Permanent Red. The tissue samples were counterstained with Harris hematoxylin and mounted with permanent mounting medium. All stained cells were assessed independently of staining intensity by estimating the percentage of positively stained vs. negatively stained cells in four randomly selected fields (320x) in each tissue sample in the superficial and deep dermis

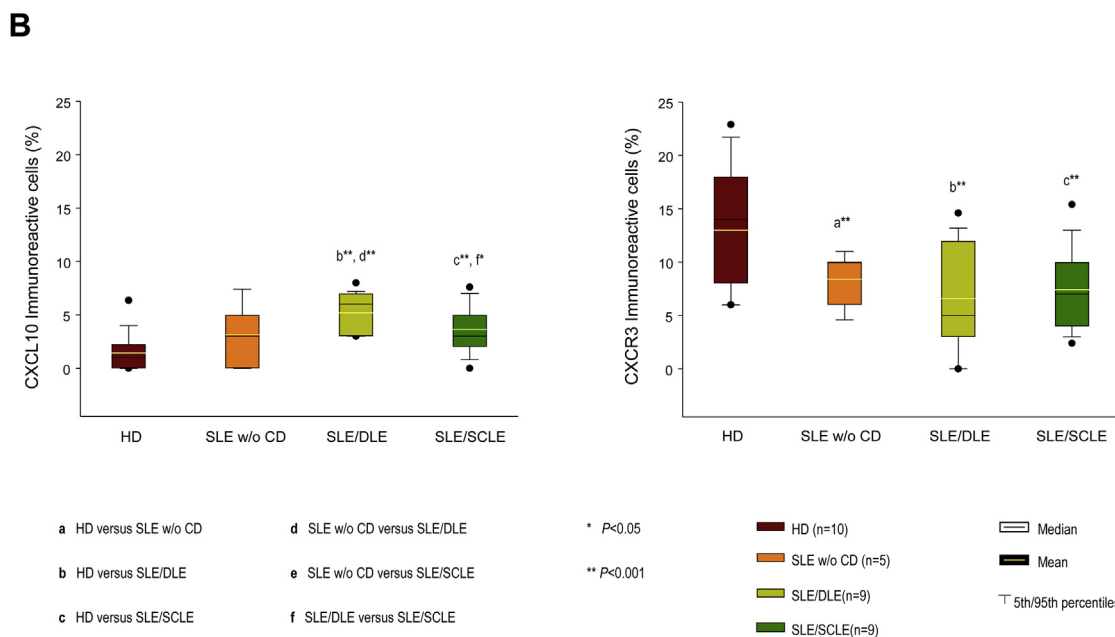
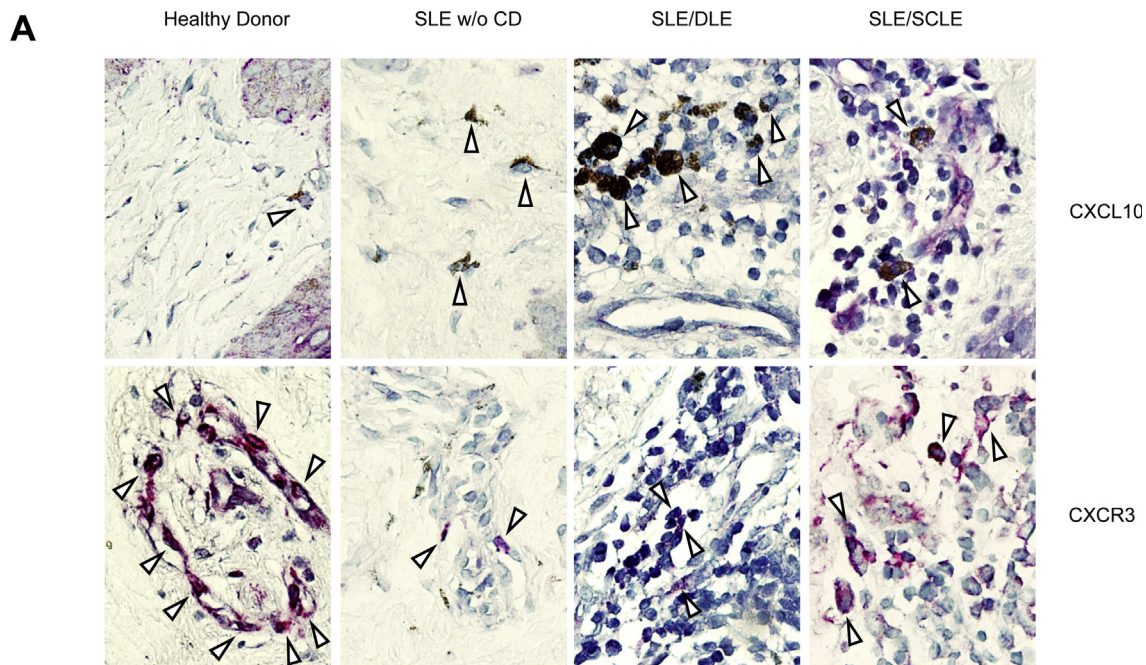


Fig. 1. Representative immunostaining for (A) CXCL10 (upper panel) and CXCR3 (lower panel) in tissue biopsies from healthy donors and SLE w/o CD, SLE/DLE and SLE/SCLE patients. Arrowheads indicate CXCL10 (in brown) and CXCR3 (in red). (C) Representative immunostaining for CCL2 (upper panel) and CCR2 (lower panel) in tissue biopsies. Arrowheads indicate CCL2 (in brown) and CCR2 (in red). (E) Representative immunostaining for CCL27 (upper panel) and CCR10 (lower panel) in tissue biopsies from healthy donors and SLE w/o CD, SLE/DLE and SLE/SCLE patients. Arrowheads indicate CCL27 (in brown) and CCR10 (in red). (G) Representative immunostaining for CXCL13 (upper panel) and CXCR5 (lower panel) in tissue biopsies from healthy donors and SLE w/o CD, SLE/DLE and SLE/SCLE patients. Arrowheads indicate CXCL13 (in red) and CXCR5 (in brown). (I) Representative immunostaining for CXCL8 (upper panel) and CXCR1 (lower panel) in tissue biopsies from healthy donors and SLE w/o CD, SLE/DLE and SLE/SCLE patients. Arrowheads indicate CXCL8 (in red) and CXCR1 (in brown). (K) Representative immunostaining for CCL17 (upper panel) and CCR4 (lower panel) in tissue biopsies from healthy donors and SLE w/o CD, SLE/DLE and SLE/SCLE patients. Arrowheads indicate CCL17 (in brown) and CCR4 (in red). (M) Representative immunostaining for CCL20 (upper panel) and CCR6 (lower panel) in tissue biopsies from healthy donors and SLE w/o CD, SLE/DLE and SLE/SCLE patients. Arrowheads indicate CCL20 (in red) and CCR6 (in brown). The original magnification was 600X. (B, D, F, H, J, L, N) Percentage of immunoreactive cells per microscopic field. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of the cells. Negative control staining was performed with normal human serum diluted 1:100 instead of a primary antibody and the IHC universal negative control reagent specifically designed to work with rabbit, mouse, and goat antibodies (IHC universal negative control reagent, Enzo Life Sciences). The reactive blank was incubated with phosphate-buffered saline-egg albumin (Sigma-Aldrich) instead of a

and were reported as the percentage of immunoreactive cells. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of the cells. Negative control staining was performed with normal human serum diluted 1:100 instead of a primary antibody and the IHC

universal negative control reagent specifically designed to work with rabbit, mouse, and goat antibodies (IHC universal negative control reagent, Enzo Life Sciences). The reactive blank was incubated with phosphate-buffered saline-egg albumin (Sigma-Aldrich) instead of a

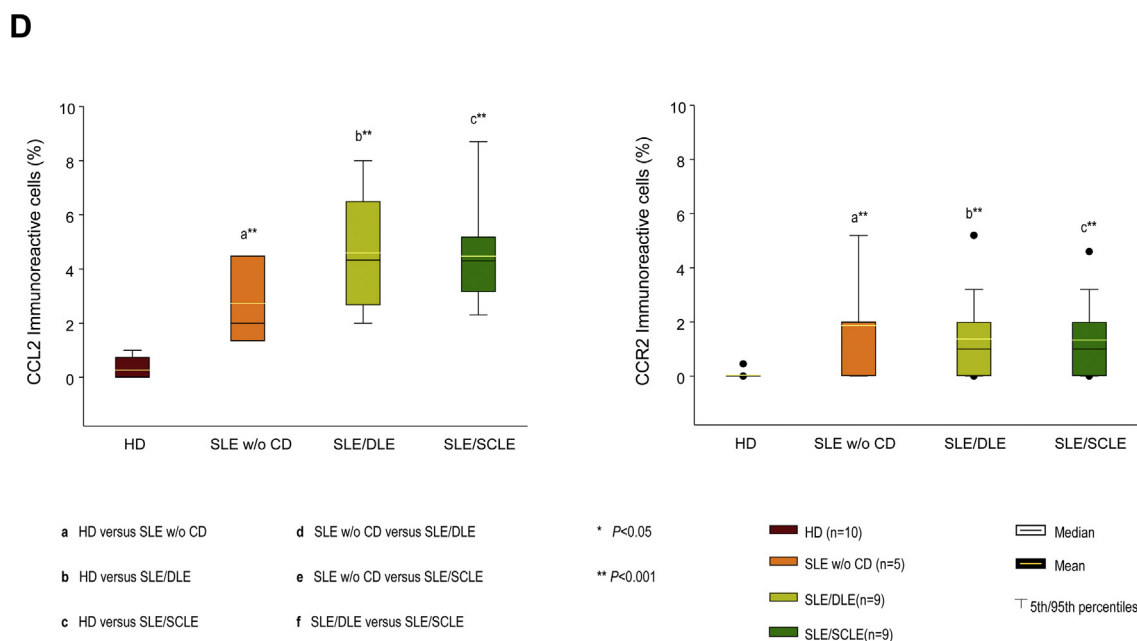
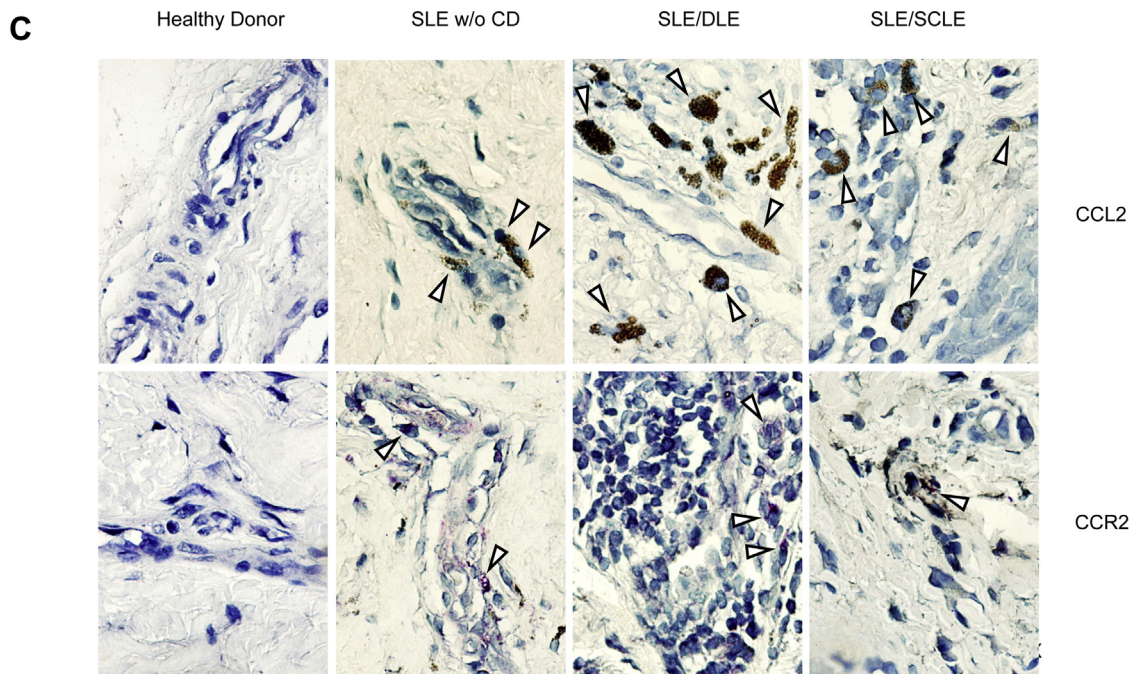


Fig. 1. (continued)

primary antibody. All controls were used to exclude nonspecific staining or endogenous enzymatic activities [8].

2.5. Immunohistochemistry for effector CD4 T cells and regulatory cell subpopulations

IL-22-expressing cells were assessed in 4-µm-thick sections of available formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Endogenous peroxidase activity and binding to nonspecific proteins were blocked with 3% H₂O₂ and 3% normal serum, respectively. The tissue samples were incubated with 10 µg/mL goat polyclonal anti-human IL-22 antibody (Santa Cruz Biotechnology). Binding was identified with a biotinylated donkey anti-goat IgG antibody (ABC Staining System; Santa Cruz Biotechnology). The slides were incubated with HRP-streptavidin, followed by the peroxidase substrate DAB (Sigma-Aldrich) for 10 min. The

sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated with alcohol and xylene, and mounted in resin.

To determine the subpopulations of CD4+/IL-17A+ cells (potentially Th17 cells), CD4+/IL-4+ cells (potentially Th2 cells), CD4+/IFN-γ+ cells (potentially Th1 cells), CD25+/Foxp3+ regulatory T cells (potentially Tregs), CD20+/IL-10+ B cells (potentially Bregs), and CD123+/IDO+ plasmacytoid dendritic cells (potentially pDCregs), simultaneous detection was performed (MultiView (mouse-HRP/rabbit-AP) Enzo Life Sciences). A rabbit polyclonal anti-CD4, anti-CD20, anti-CD25 IgG (Santa Cruz Biotechnology), or anti-CD123 IgG antibody (Abcam plc, CA, UK) or a mouse monoclonal anti-IL-17A, anti-IL-4, anti-IFN-γ, anti-IL-10, anti-Foxp3 IgG1 or anti-IDO IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology) at 10 µg/mL was visualized using HRP/DAB or alkaline phosphatase (AP)/Permanent Red as appropriate. The tissue samples were counterstained with hematoxylin and mounted in

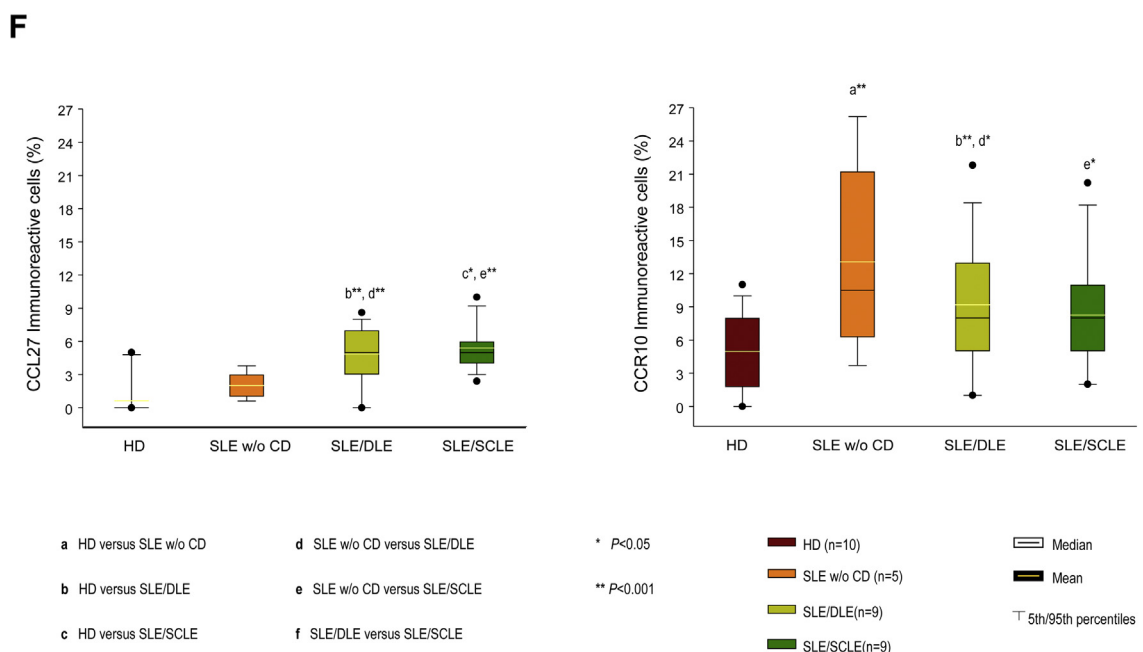
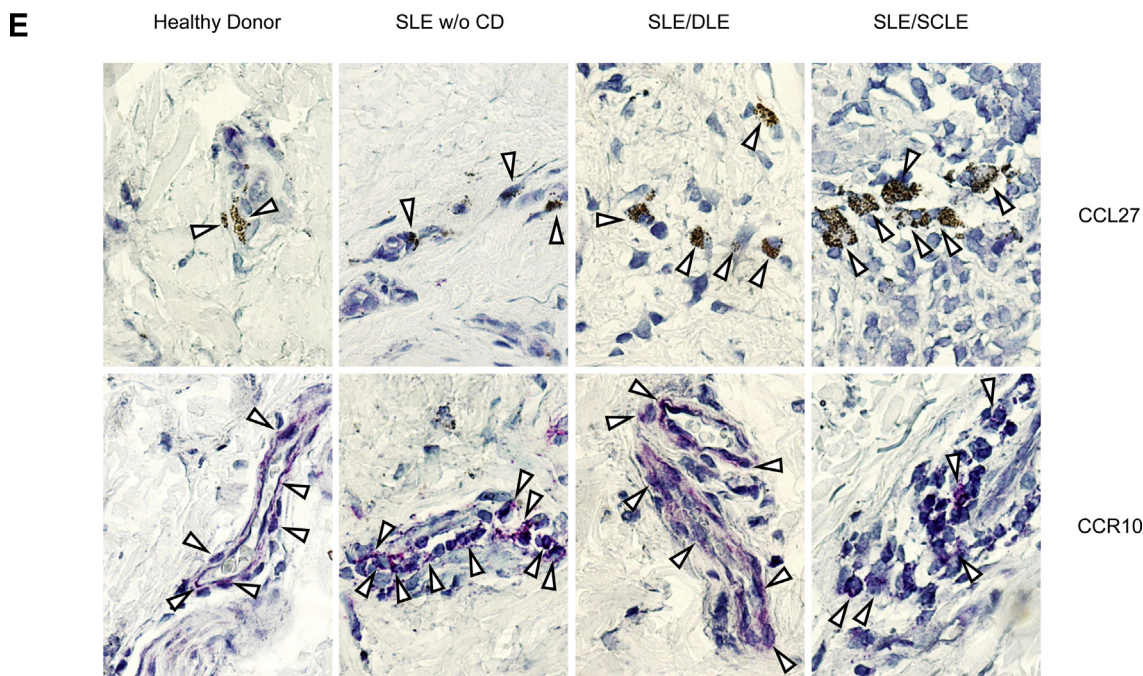


Fig. 1. (continued)

aqueous mounting medium. Double-positive cytokine-expressing cells were assessed in three fields (320x) and were reported as the percentage of immunoreactive cells. The results are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) of the cells quantified by Image Pro Plus version 5.1.1 [8].

2.6. Peripheral blood mononuclear cell isolation

Fifteen milliliters of venous blood was obtained from each subject. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by gradient centrifugation with Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway).

2.7. Flow cytometry

PBMCs were labeled with 5 µL of anti-human CD3 FITC-labeled,

anti-human CD4 PEcy5-labeled, and anti-human CD161 APC-conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA); anti-human CD3 FITC-labeled and anti-human CD4 PEcy5-labeled monoclonal antibodies (BD Biosciences); anti-human CD19 APC-labeled and anti-human CD38 PEcy5-labeled monoclonal antibodies (BD Biosciences); or anti-human CCR6 PerCP/Cy5.5-conjugated and anti-human CD123 FITC-labeled monoclonal antibodies (BD Biosciences) in separated tubes for 20 min at 37 °C in the dark. The cells were permeabilized with 200 µL of Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) at 4 °C for 30 min. Intracellular staining was performed with anti-human IL-22 PE-labeled, IL-17A PE-labeled, IL-4 PE-labeled, IFN-γ PE-labeled, Foxp3 PE-labeled, IL-10 PE-labeled, or IDO PE-labeled mouse monoclonal antibodies (BD Biosciences) for 30 min at 4 °C in the dark. Electronic gates were made for CD3+/CD4+/CD161 – cells, CD3+/CD4+/CD161 + cells, CD3+/CD4+/CD25 – cells, CD3+/CD4+/

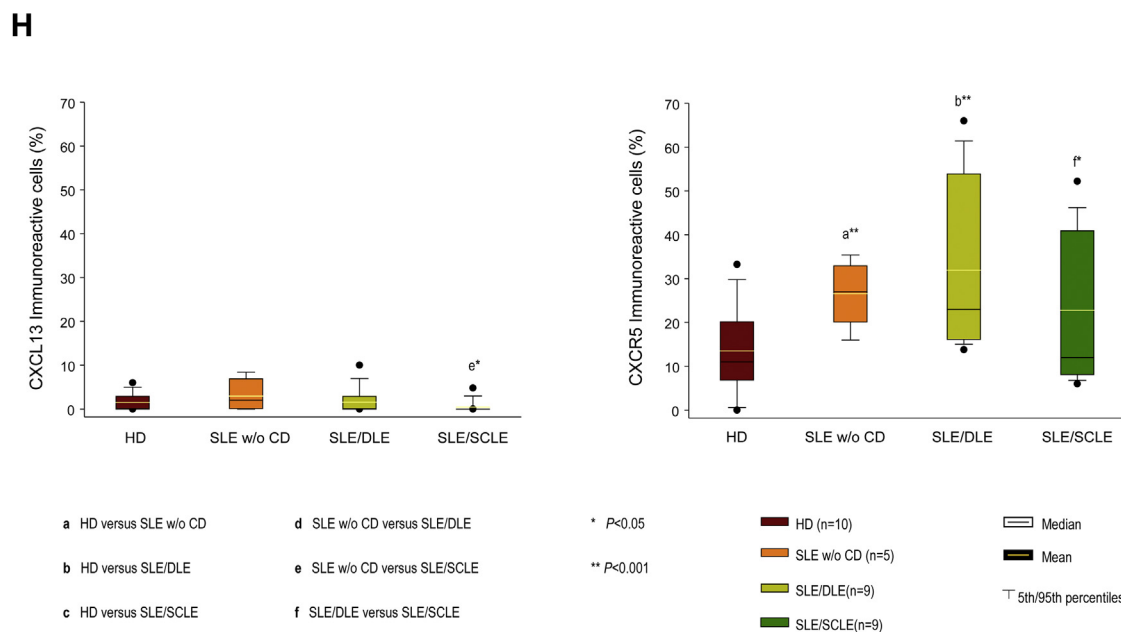
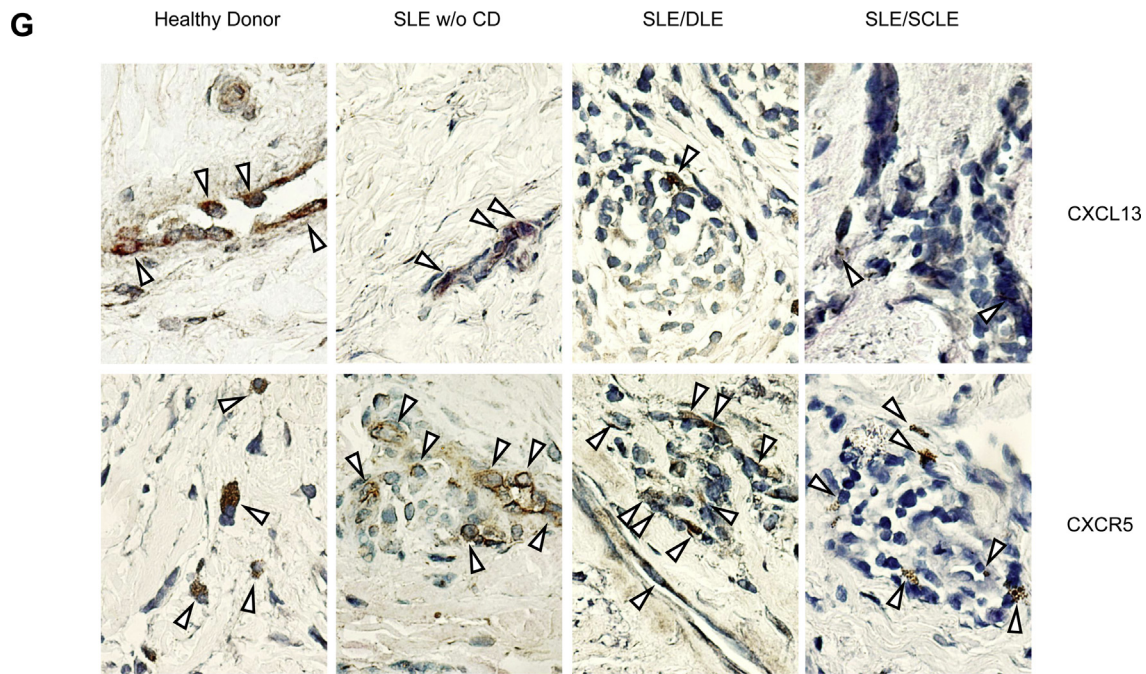


Fig. 1. (continued)

CD25hi cells, CD19+ /CD38hi cells, and CD123hi/CD196 + cells. The results are expressed as the relative percentages of IL-22-, IL-17A-, IL-4-, IFN- γ -, Foxp3-, IL-10-, and IDO-expressing cells in each gate. As isotype controls, IgG1 FITC-labeled/IgG1 PE-labeled/CD45 PE-Cy5-labeled mouse IgG1 κ antibodies (BD Tritest, BD Biosciences) were used to set the thresholds and gates on the flow cytometer. We ran an unstained (autofluorescence control) and permeabilized PBMC sample. The autofluorescence control was compared to single-stained positive control cells to confirm that the stained cells were on scale for each parameter. In addition, BD CaliBRITE 3 beads were used to adjust instrument settings, set fluorescence compensation, and check instrument sensitivity (BD CaliBRITE, BD Biosciences).

Fluorescence minus one (FMO) controls were stained in parallel using the panel of antibodies with sequential omissions of each antibody, except for the anti-IL-22, anti-IL-17A, anti-IL-4, anti-IFN- γ , anti-

Foxp3, anti-IL-10, and anti-IDO antibodies, which were replaced by an isotype control rather than simply omitted. Finally, T cell subsets were analyzed by flow cytometry with an Accuri C6 (BD Biosciences). A total of 500,000–1,000,000 events was recorded for each sample and analyzed with FlowJo X software (TreeStar, Inc.) [8].

2.8. Ethical considerations

This study was performed in accordance with the principles expressed in the Declaration of Helsinki. It was approved by the Ethical and Medical Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (Ref. 822), and written informed consent was obtained from all subjects.

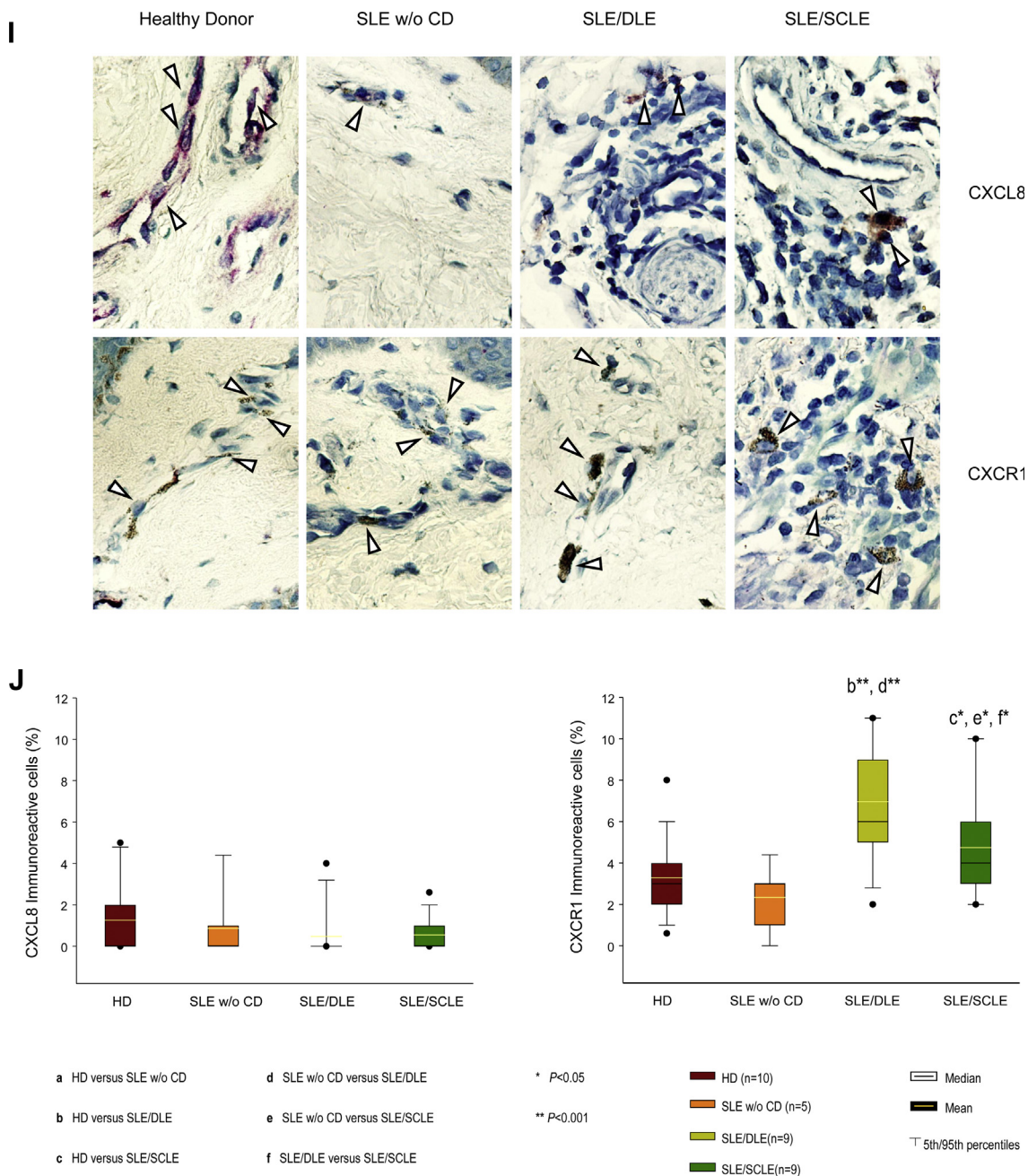


Fig. 1. (continued)

2.9. Statistical analysis

Descriptive statistics were performed, and categorical variables were compared using the χ^2 test or Fisher's exact test. Immunohistochemical statistical analysis was performed using one-way analysis of variance on ranks by the Holm-Sidak method and Dunn's test for all pairwise multiple comparison procedures. We report non-parametric correlations using Spearman coefficients between (1) the CLASI activity score and chemokines/receptors; (2) the tissue chemokine/receptor expression and CD4 T/regulatory cells; and (3) the tissue chemokine/receptor expression and circulating CD4 T/regulatory cells.

Statistical analyses were performed using the Sigma Stat 11.2 program (Aspire Software International, Leesburg, VA, USA). Data are expressed as the median, range, and mean \pm standard deviation (SD)/standard error of the mean (SEM). P values less than or equal to 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Clinical and demographic characteristics of patients

We included 18 patients with cutaneous lupus, 9 with SLE/DLE and 9 with SLE/SCLE without another autoimmune comorbidity. As controls, we included 5 patients with SLE w/o CD and 10 healthy donors. The demographic, laboratory and clinical data of the patients and controls are shown in Table 1. Compared with the other groups, the group comprising patients with SLE/SCLE had the highest CLASI scores ($P = 0.03$) as well as the highest-modified SLEDAI scores ($P = 0.02$).

3.2. Expression of chemokines and their receptors

The expression of CXCL10 was increased in the SLE/DLE patients compared with the SLE/SCLE and SLE w/o CD patients and healthy

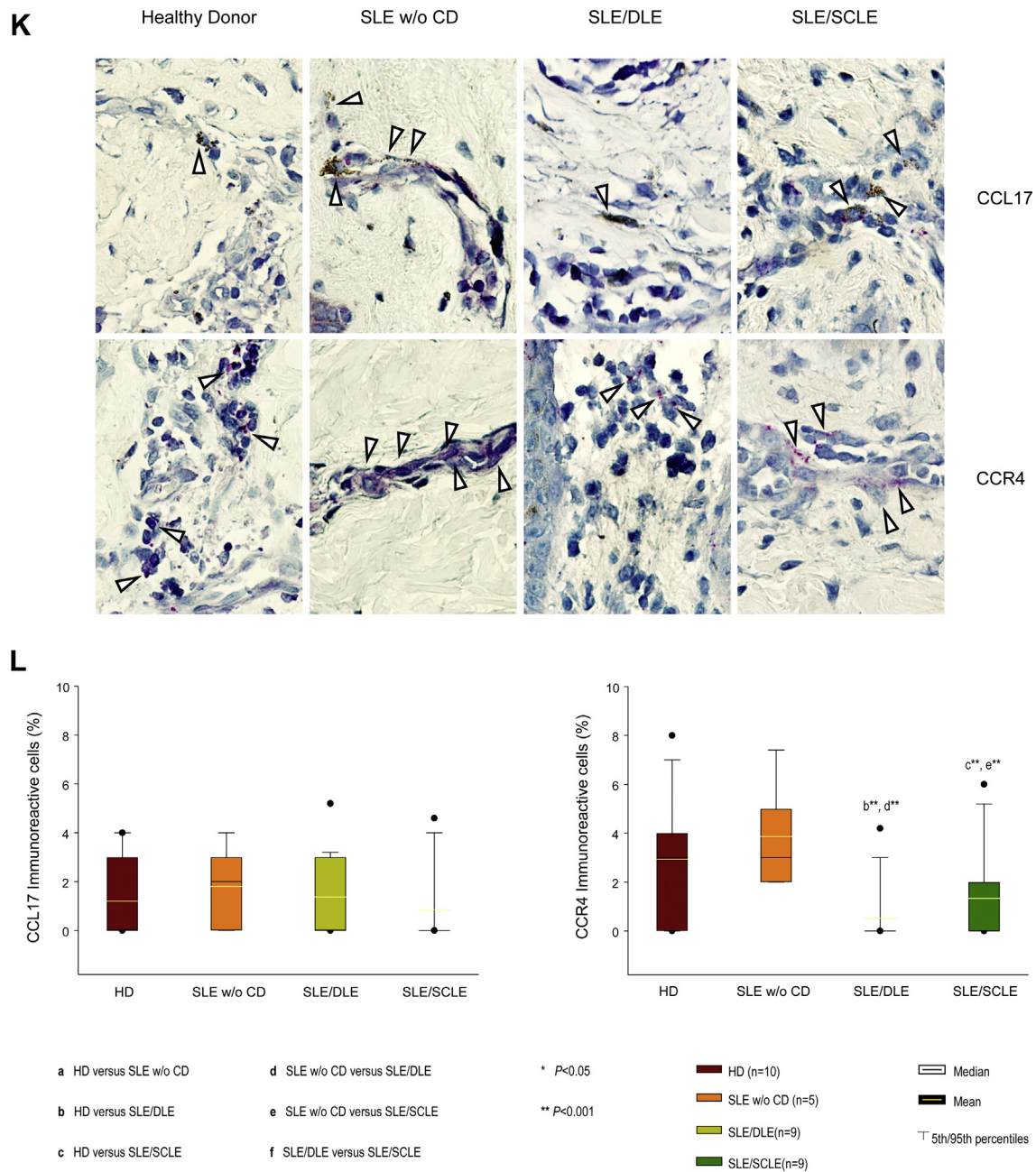


Fig. 1. (continued)

donors (Supplementary Table 1). Conversely, the expression of its receptor CXCR3 was conspicuously higher in the healthy control group than in the other groups (Fig. 1A and B; Supplementary Table 1).

Tissue from all lupus patients (with or without CLE) had higher expression of CCL2 than that from the healthy controls (Supplementary Table 1). Similarly, the expression of CCR2 was practically absent in the healthy controls. We did not find any difference when comparing the SLE/DLE subgroup versus the SLE/SCLE subgroup (Fig. 1C and D; Supplementary Table 1).

The number of CCL27 + cells was higher in the skin of the SLE/DLE and SLE/SCLE patients than in that of the healthy controls and SLE w/o CD patients (Table 2). However, there was no difference when we compared the SLE group without skin involvement with the healthy control group. Moreover, the number of cells that expressed CCR10 was increased in the SLE w/o CD and SLE/DLE groups compared with the healthy control group (Fig. 1E and F; Supplementary Table 1).

The tissue samples from the patients with SLE w/o CD showed a

higher proportion of CXCL13 + cells than those from the SLE/SCLE patients (Supplementary Table 1). However, noticeably higher expression of the CXCL13 receptor CXCR5 was observed in the SLE/DLE group than in the healthy control and SLE/SCLE groups (Fig. 1G and H; Supplementary Table 1).

We also found higher expression of CXCR1 in the SLE/DLE and SLE/SCLE groups than in the SLE w/o CD and healthy control groups, with the highest expression in the SLE/DLE group (Supplementary Table 1). There were no significant differences in the expression of CXCL8 among the groups (Fig. 1I and J; Supplementary Table 1). We studied CCL17 and did not observe any differences among the groups (Supplementary Table 1). However, lower CCR4 immunoreactivity was found in the SLE/DLE and SLE/SCLE groups compared with the SLE w/o CD and healthy control groups (Fig. 1K and L; Supplementary Table 1).

Finally, the CCL20 immunoreactivity was higher in the SLE group than in the healthy control and SLE/DLE groups (Supplementary Table 1), whereas CCR6 was mainly expressed in both the SLE/DLE and

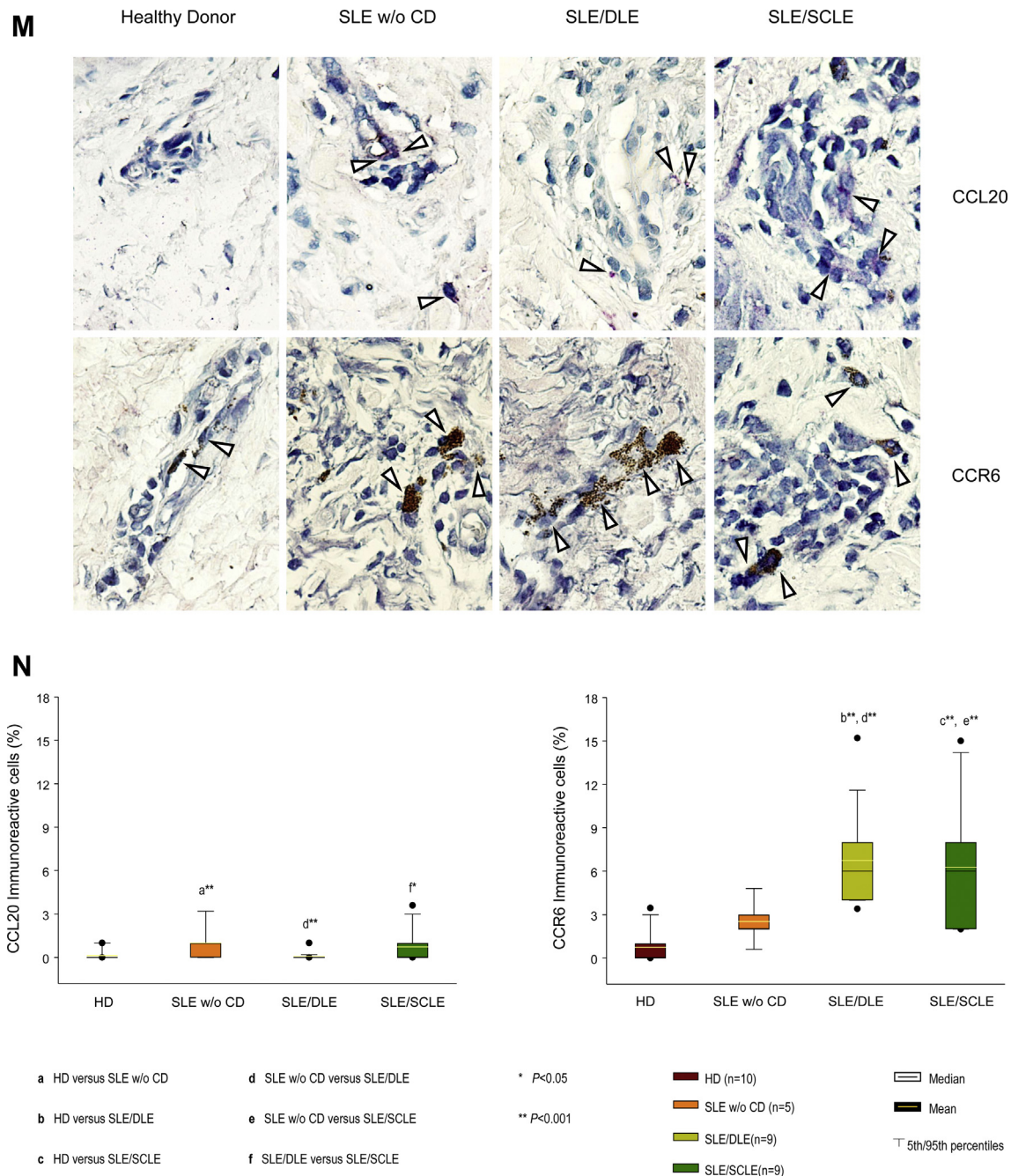


Fig. 1. (continued)

SLE/SCLE groups and not in the SLE w/o CD and healthy control groups (Fig. 1M, N; Supplementary Table 1).

3.3. CD4 effector T cell and regulatory cell subpopulations in the tissue from patients with cutaneous lupus

3.3.1. Proinflammatory/antifibrogenic cytokine expression

The IL-22 + cell percentage was significantly increased in the SLE/DLE tissue samples compared to the SLE/SCLE, SLE w/o CD, and healthy control tissue samples, while the IL-22 + cell number was increased in the SLE/SCLE group versus the SLE w/o CD and healthy donor groups (Fig. 2A; Supplementary Table 2).

The IL-17A + /CD4 + T cell frequency was conspicuously higher in the tissue samples from the patients with SLE/DLE than in the SLE/SCLE patient or healthy donor tissue samples. Moreover, a higher

immunoreactive cell number was found in the tissue from the SLE/SCLE group compared with that from the SLE w/o CD and healthy donor groups (Fig. 2B; Supplementary Table 2). The tissue from the SLE/DLE patients had a significantly higher percentage of IFN- γ + /CD4 + T cells than that from the SLE/SCLE patients, SLE w/o CD patients, or healthy donors. In addition, the number of IFN- γ + /CD4 + T cells in the skin from the SLE/SCLE patients was increased compared with that in the skin from the SLE patients and healthy donors (Fig. 2D; Supplementary Table 2).

3.3.2. Anti-inflammatory/profibrogenic cytokine expression

Tissue from the SLE/DLE and SLE/SCLE patients had significantly higher IL-4 + /CD4 + T cell percentages than that from the SLE w/o CD patients and healthy donors. There were no statistically significant differences between the SLE/DLE and SLE/SCLE patient groups

Table 2
Spearman's correlation between chemokine/chemokine receptor and effector CD4⁺ T cell and regulatory cell subpopulations from tissue and periphery of patients with cutaneous lupus erythematosus.

Group		Periphery															
		Tissue						Periphery						pDCreg			
		Th22	Th17	Th2	Th1	Treg	Breg	pDCreg	Th22	Th17	Th2	Th1	Treg		Breg		
Healthy Donors	CXCL10	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCL2	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR6	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCL20	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCL27	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR10	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCL8	Rho; P	-0.67; 0.03	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCL13	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR2	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR4	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SLE	CCL27	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR10	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCL8	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCL10	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCR3	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCL2	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR2	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR4	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCL8	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCL13	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SLE/DLE	CXCL10	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCR3	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCL2	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR2	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR4	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCL8	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCR5	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCL13	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCL2	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR2	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SLE/SCLE	CCR4	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR6	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCL27	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCR1	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCR5	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCL2	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR2	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CCR4	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCL8	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CXCR5	Rho; P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: non-significant.

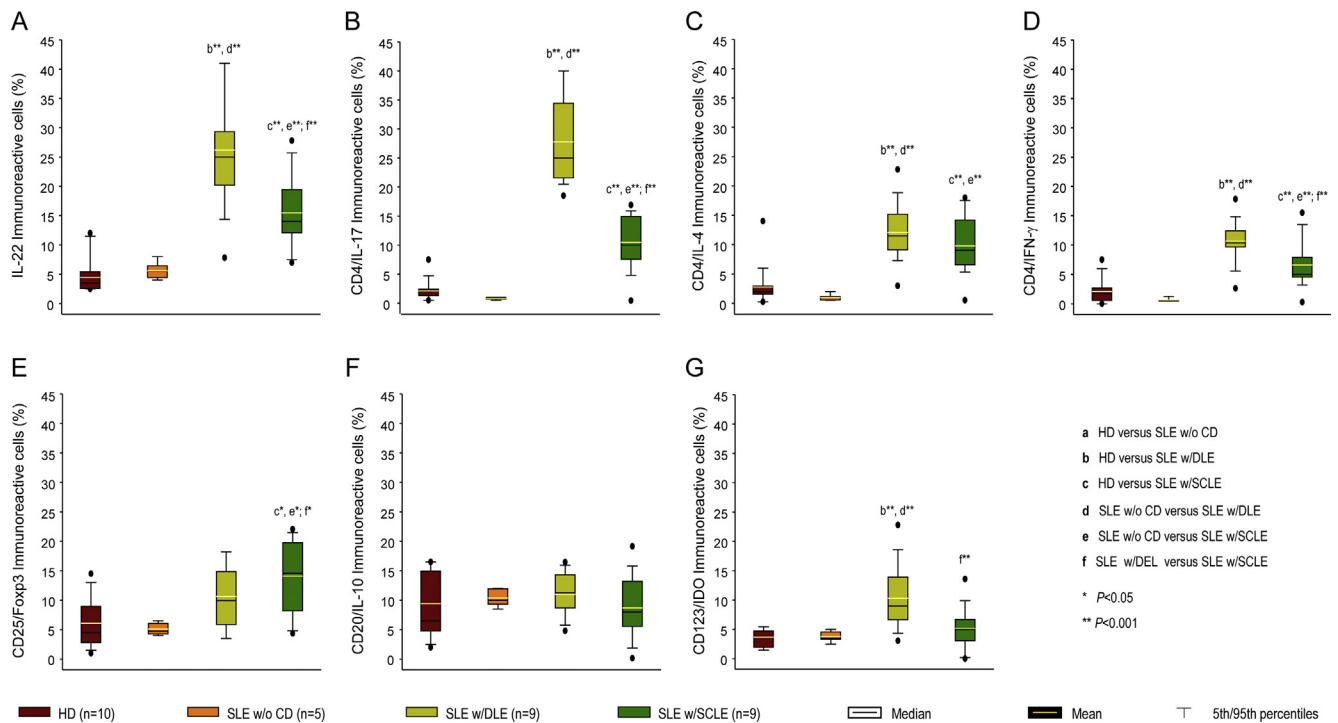


Fig. 2. Percentage of immunoreactive CD4 effector T cells and regulatory cells per microscopic field in the skin tissue. The results are expressed as the mean (horizontal yellow line), median (horizontal black line), and 5th/95th percentiles of positive cells. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(Fig. 2C; Supplementary Table 2).

3.3.3. Regulatory cells

The percentage of Tregs in tissue from the SLE/SCLE patients was higher than that in tissue from the SLE/DLE patients, SLE w/o CD patients and healthy donors. Nonetheless, there were no significant differences between the SLE/DLE patients and healthy donors (Fig. 2D; Supplementary Table 2).

There were no statistically significant differences in the IL-10 + /CD20 + B cell percentage among the groups (Fig. 2F; Supplementary Table 2).

Finally, the SLE/DLE patients had the highest percentage of CD123 + /IDO + pDCregs (Fig. 2G; Supplementary Table 2).

3.4. CD4 effector T cell and regulatory cell subpopulations in the peripheral blood from patients with cutaneous Lupus

3.4.1. Proinflammatory/antifibrogenic cytokine expression

The relative percentages of circulating CD4 + /CD161 - /IL-22 + , CD4 + /CD161 + /IL-17A + , and CD4 + /CD25 - /IFN- γ + cells in the SLE/DLE patients were higher than those in the SLE/SCLE patients, SLE w/o CD patients and healthy donors. Moreover, the levels of the CD4 + /CD161 - /IL-22 + , CD4 + /CD161 + /IL-17A + , and CD4 + /CD25 - /IFN- γ + subsets were increased in the SLE/SCLE patients versus the SLE patients and healthy donors (Figs. 3A and 4A, B and D; Supplementary Table 3).

3.4.2. Anti-inflammatory/profibrogenic cytokine expression

Regarding the anti-inflammatory/profibrogenic CD4 + /CD25 - /IL-4 + cell percentage, there were significant increases in the SLE/DLE and SLE/SCLE patients compared to the healthy donors (Fig. 3A and 4C; Supplementary Table 3), while the CD4 + /CD25 - /IL-4 + cell percentage was lower in the SLE/DLE and SLE/SCLE patients than in the SLE w/o CD patients. Furthermore, there were no differences in the CD4 + /CD25 - /IL-4 + cell relative percentages between the SLE/SCLE and SLE/

DLE patients (Fig. 3A and 4C; Supplementary Table 3).

3.4.3. Regulatory cells

The percentage of Forkhead box P3-expressing CD4 T cells showed a statistically significant decrease in the SLE/SCLE and SLE w/o CD patients compared with the healthy donors. There were no statistically significant differences between the SLE/DLE and SLE/SCLE patients (Fig. 3B and 4E; Supplementary Table 3).

In addition, the relative percentage of IL-10-producing B cells was higher in the SLE/DLE patients than in the SLE/SCLE and SLE w/o CD patients and healthy donors (Fig. 3B and 4F; Supplementary Table 3).

The percentage of IDO-expressing CD123 + /CD196 + cells was conspicuously higher in the SLE/DLE and SLE w/o CD patients than in the SLE/SCLE patients and healthy donors (Fig. 3B and 4G; Supplementary Table 3).

3.5. Correlations in cutaneous lupus erythematosus among chemokines/receptors, the CLASI activity score, pain and pruritus

We found positive correlations between the pain score and CCL2 (Spearman's rho: 0.77, $P = 0.01$) or CCR6 expression (Spearman's rho: 0.75, $P = 0.02$) in the SLE/SCLE patients. We did not find any significant correlations with the CLASI activity score.

3.6. Correlations between effector CD4 T cell/regulatory cell subpopulations and chemokine/chemokine receptor expression

3.6.1. CD4/IL-22 and chemokine/chemokine receptor expression

In the periphery, a positive correlation was determined in SLE/DLE between the CD4 + /CD161 - /IL-22 + cell subset and the expression of CCL17 (Spearman's rho: 0.69, $P = 0.03$), while negative correlations were found in SLE/SCLE between CD4 + /CD161 - /IL-22 + cells and the expression of CCL2 (Spearman's rho: -0.89, $P = 0.002$), CCR4 (Spearman's rho: -0.85, $P = 0.007$), and CCR6 (Spearman's rho: -0.74, $P = 0.03$). In the SLE w/o CD patients, the correlations between

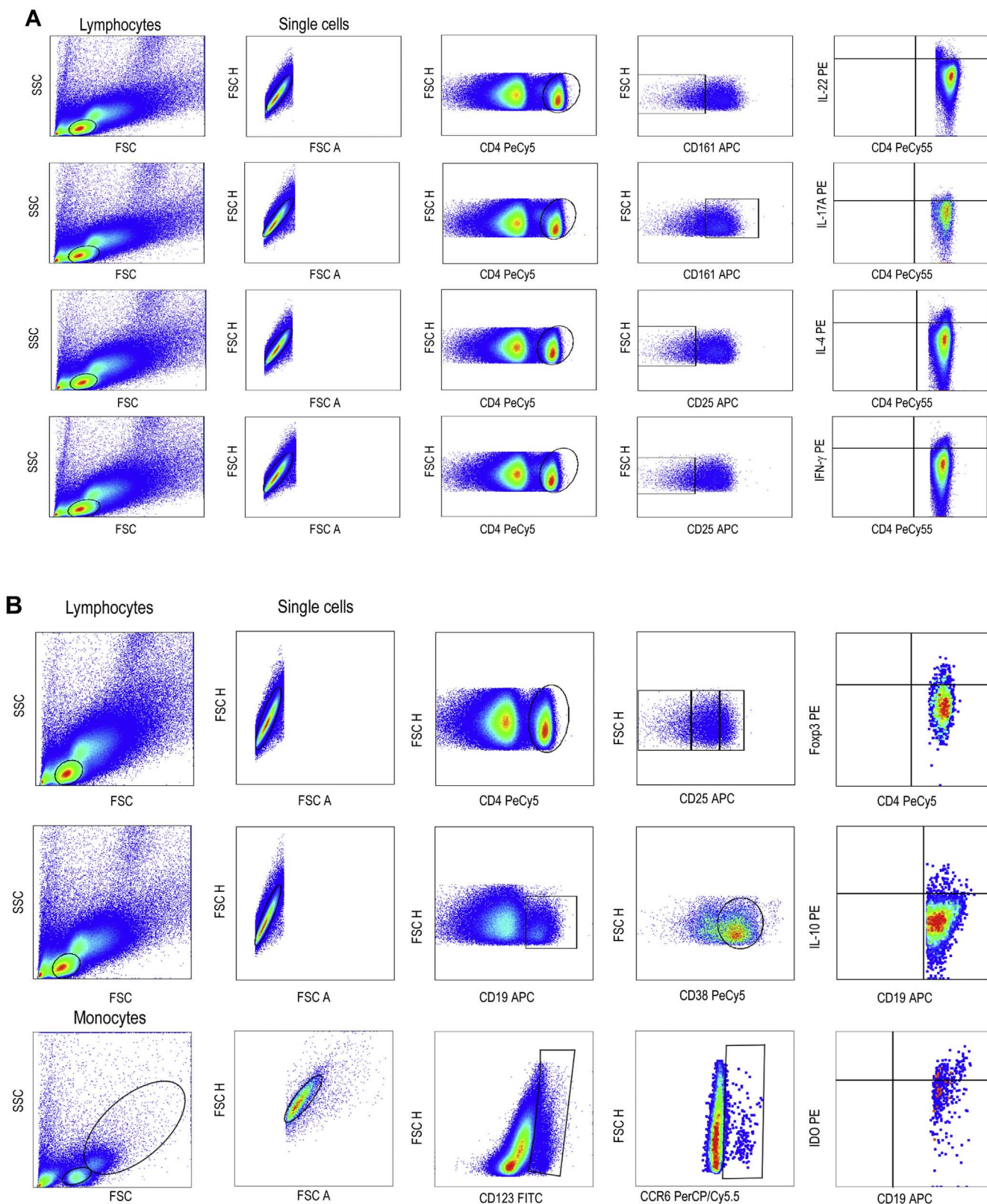


Fig. 3. (A) Representative gating strategy for each cell subpopulation of CD4 effector T cells. (B) Representative gating strategy for each cell population of regulatory cells in a DLE patient.

CD4⁺/CD161⁻/IL-22⁺ cells and chemokine/chemokine receptor expression were not significant (Table 2).

In the tissue, a negative correlation was found in SLE/DLE between the CD4⁺/IL-22⁺ cell subset and the expression of CXCL8

(Spearman's rho: -0.73, *P* = 0.02) and in SLE/SCLE between CD4⁺/IL-22⁺ cells and CCR4 (Spearman's rho: -0.76, *P* = 0.01). In the SLE w/o CD patients, the correlations between CD4⁺/IL-22⁺ cells and chemokine/chemokine receptor expression were not significant

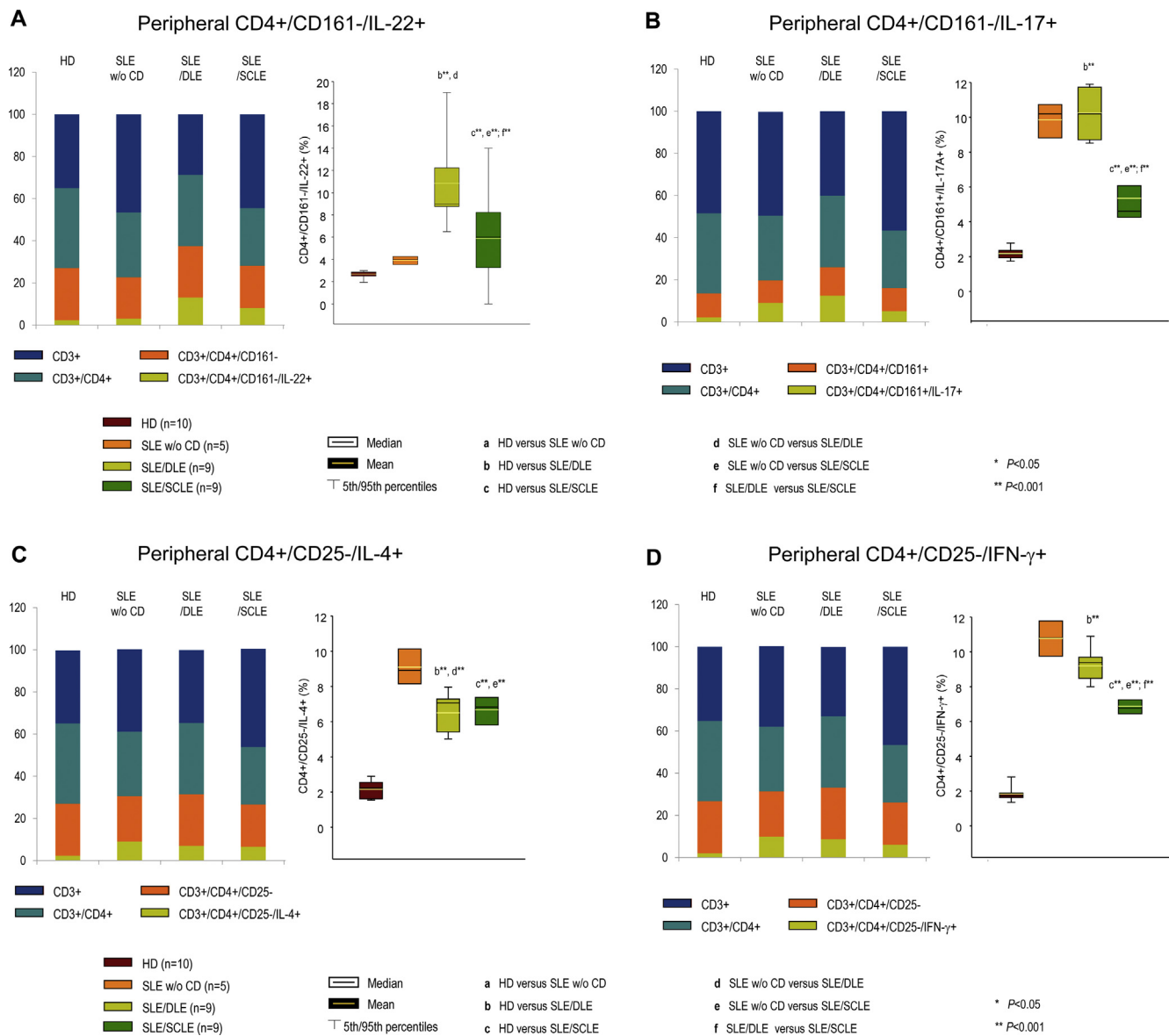


Fig. 4. Percentages of circulating (A) CD4+/CD161-/IL-22+ cells, (B) CD4+/CD161-/IL-17A+ cells, (C) CD4+/CD25-/IL-4+ cells, (D) CD4+/CD25-/IFN- γ + cells, (E) CD4+/CD25hi/Foxp3+ cells, (F) CD19+/CD38hi/IL-10+ cells, and (G) CD123+/CD196-/IDO+ cells. The results are expressed as the mean (horizontal yellow line), median (horizontal black line), and 5th/95th percentiles * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(Table 2).

3.6.2. Th17 cells and chemokine/chemokine receptor expression

In the periphery, a positive correlation was determined in SLE/DLE between the CD4+/CD161+/IL-17A+ cell subset and the expression of CCL17 (Spearman's rho: 0.67, $P = 0.04$), while a negative correlation was found between the CD4+/CD161+/IL-17A+ cell subset and the expression of CXCL8 (Spearman's rho: -0.73, $P = 0.02$). In the SLE/SCLE patients, the correlations between CD4+/CD161+/IL-17A+ cells and chemokines were not significant. In the SLE w/o CD patients, a negative correlation was found between the CD4+/CD161+/IL-17A+ cell subset and the expression of CXCL8 (Spearman's rho: -0.94, $P = 0.01$), while a positive correlation was found with CXCR10 (Spearman's rho: 0.97, $P = 0.005$) (Table 2).

In the tissue, a positive correlation was found in SLE/DLE between the IL-17A-expressing CD4 T cell subset and the expression of CXCR3 (Spearman's rho: 0.74, $P = 0.02$), while a negative correlation was found between the CD4+/IL-17A+ cell subset and the expression of

CCL2 (Spearman's rho: -0.69, $P = 0.03$). In the SLE patients, a negative correlation was found between the CD4+/IL-17A+ cell subset and the expression of CCL27 (Spearman's rho: -0.91, $P = 0.02$) (Table 2).

3.6.3. Th2 cells and chemokine/chemokine receptor expression

In the periphery, a negative correlation was determined in SLE/DLE between IL-17- and IL-4-expressing CD4 T cells and the expression of CXCL8 (Spearman's rho: -0.73, $P = 0.02$; Table 2).

3.6.4. Th1 cells and chemokine/chemokine receptor expression

In the periphery, a positive correlation was determined in SLE/DLE between the CD4+/CD25-/IFN- γ + cell subset and the expression of CXCR5 (Spearman's rho: 0.72, $P = 0.02$), while the correlations between the CD4+/CD25-/IFN- γ + cell subset and the expression of chemokines/chemokine receptors were not significant in the SLE/SCLE or SLE patients (Table 2).

In the tissue, a positive correlation was found in SLE/DLE between the IFN- γ -expressing CD4 T cell subset and the expression of CCR2

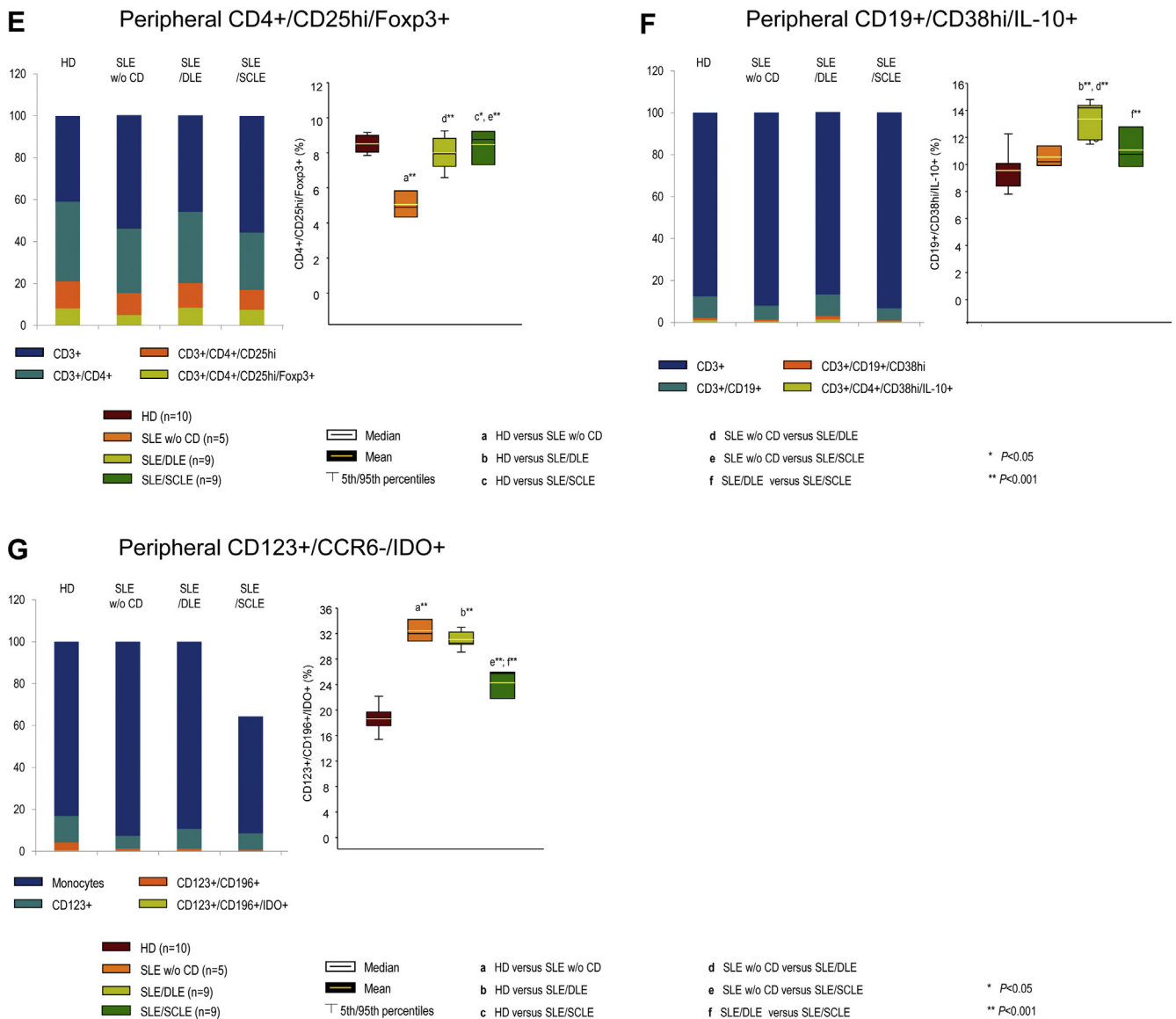


Fig. 4. (continued)

(Spearman's rho: 0.71, $P = 0.03$), while a negative correlation was determined in SLE/SCLE between the CD4+/IFN- γ + cell subset and the expression of CCL27 (Spearman's rho: -0.66 , $P = 0.05$). In the SLE w/o CD patients, the correlations between CD4+/IFN- γ + cells and chemokine/chemokine receptor expression were not significant (Table 2).

3.6.5. Forkhead box P3-expressing CD4 T cells and chemokine/chemokine receptor expression

In the periphery, positive correlations were determined in SLE/SCLE between the CD4+/CD25hi/Foxp3 + cell subset and the expression of CCR2 (Spearman's rho: 0.73, $P = 0.04$) or CXCR1 (Spearman's rho: 0.74, $P = 0.03$). A negative correlation was determined in SLE/DLE between CD4+/CD25hi/Foxp3 + subset and the expression of CXCR5 (Spearman's rho: -0.73 , $P = 0.002$) (Table 2).

In the tissue, a negative correlation was found in SLE/SCLE between the Foxp3-expressing CD4 T cell subset and the expression of CCL2 (Spearman's rho: -0.68 , $P = 0.04$), while correlations between Foxp3-expressing CD4 T cells and the expression of chemokines/chemokine receptors were not significant in SLE/DLE. In the SLE w/o CD patients, a positive correlation was found between Tregs and the expression of CCR2 (Spearman's rho: 0.90, $P = 0.03$), and a negative correlation was

found between Tregs and CCR4 expression (Spearman's rho: -0.94 , $P = 0.01$) (Table 2).

3.6.6. IL-10-producing B cells and chemokine/chemokine receptor expression

In the periphery, a positive correlation was determined in SLE/SCLE between CD19+/CD38hi/IL-10 + cells and the expression of CXCR5 (Spearman's rho: 0.74, $P = 0.03$). The correlations between the CD19+/CD38hi/IL-10 + cell subset and chemokine/chemokine receptor expression in SLE/DLE and SLE were not significant (Table 2).

In the tissue, negative correlations were found in SLE/SCLE between the IL-10-producing, CD20-expressing B cell subset and the expression of CCL2 (Spearman's rho: -0.71 , $P = 0.03$), CCR4 (Spearman's rho: -0.82 , $P = 0.007$) or CXCL13 (Spearman's rho: -0.70 , $P = 0.03$). In SLE/DLE a negative correlation was determined between IL-10-producing CD20-expressing B cell subset and the expression of CXCL13 (Spearman's rho: -0.70 , $P = 0.03$). However, in the SLE w/o CD patients, a negative correlation was found between the IL-10-producing CD20-expressing B cell subset and the expression of CCR4 (Spearman's rho: -0.97 , $P = 0.005$) (Table 2).

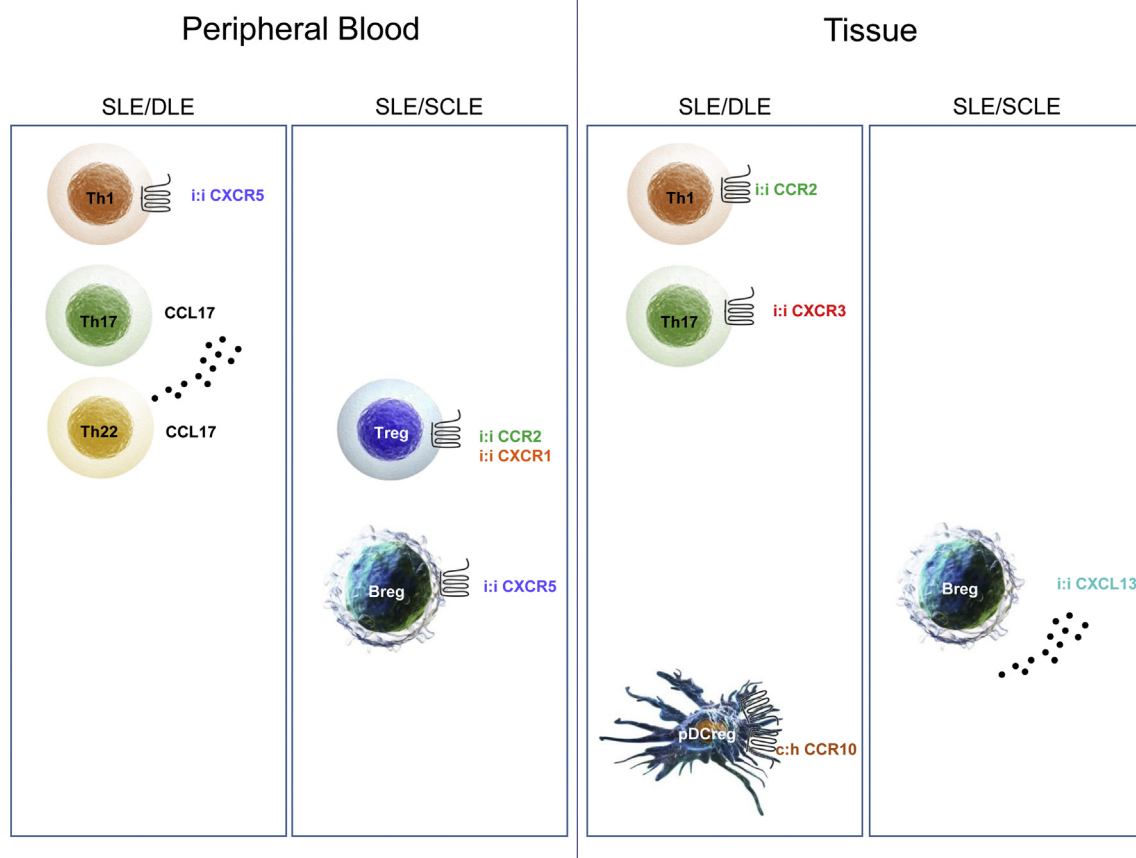


Fig. 5. Hypothetical model of the expression and interaction of the main correlations of chemokines and their receptors with CD4 effector T cells and regulatory cells (A) in the periphery and (B) in the skin tissue of discoid (SLE/DLE) and subacute lupus (SLE/SCLE). c:h, constitutive:basal trafficking/homing; i:i inducible:inflammatory.

3.6.7. IDO and CD123-expressing plasmacytoid dendritic cells and chemokine/chemokine receptor expression

In the periphery, negative correlations were determined in SLE/DLE between CD123+/CD196+/IDO+ cells and the expression of CXCL10 (Spearman's rho: -0.74 , $P = 0.02$) or CCR4 (Spearman's rho: -0.71 , $P = 0.03$). A negative correlation was also found in SLE/SCLE between CD123+/CD196+/IDO+ cells and the expression of CCL2 (Spearman's rho: -0.73 , $P = 0.04$). A positive correlation was also determined in SLE between pDCregs and the expression of CCR4 (Spearman's rho: 0.97 , $P = 0.005$) (Table 2).

In the tissue, a positive correlation was found in SLE/DLE between the IDO-expressing subset and the expression of CCR10 (Spearman's rho: 0.73 , $P = 0.02$). Correlations between CD123+/IDO+ cells and chemokine/chemokine receptor expression in SLE/DLE and SLE were not significant (Table 2).

4. Discussion

CLE is a complex clinical entity whose pathophysiology remains to be fully characterized but encompasses interactions between genetics, the environment, cells (keratinocytes, endothelial cells, neutrophils, dendritic cells, T cells and B cells) and cell products. In this sense, chemokines and their receptors are involved in the regulation of infiltration into inflamed cellular sites. Few studies have assessed the complex cell, cytokine and chemokine network in CLE [9]. In a previous study, we showed the participation of Th22, Th17 and Th1 cells as well as pDCregs in DLE and SCLE patients; this response was more intense in DLE than in SCLE [8]. Herein, we now explored the chemokine profiles of these patients and correlated these profiles with tissue-infiltrating and circulating effector CD4 T cell/regulatory cell subpopulations.

In vitro, UV-irradiated keratinocytes release lymphocyte chemoattractants such as CCL5, CCL22, CCL27, and CXCL28 [10,11]. Most skin-infiltrating lymphocytes in patients suffering from inflammatory and autoimmune skin conditions express CCR10, while epidermal basal keratinocytes express CCL27. The latter is a TNF- α - and IL-1 β -induced chemokine that plays a pivotal role during the recruitment of circulating CCR10-positive memory T cells into the skin [11]. In this work, we observed increased immunoreactivity for CCL27 and its receptor CCR10 in patients with CLE versus healthy controls, with this immunoreactivity being highest in the DLE subset.

Some authors have reported the predominance of the Th1 response in cutaneous lupus. Type I IFNs produced by plasmacytoid dendritic cells recruit Th1 lymphocytes to lesions by upregulating the production of CXCL10 by keratinocytes and other skin cells [9] as well as recruiting CXCR3-positive lymphocytes (Th1, Th17, Th2, and CD8+ T cells) into the skin with a concomitant decrease in the peripheral blood [12–14]. Moreover, IFN- γ induces the expression of CXCL9, CXCL10, CXCL11 and their receptor CXCR3 in Th1 cells [13,15]. In CLE tissue, CXCL10 is most prominent at the interface between the epidermis and dermis, whereas CXCR3-positive lymphocytes invade the epidermis [16]. Furthermore, a study showed that higher mRNA expression of CXCL9 and CXCL10 correlates with IFN- γ expression in different subsets in CLE and that the expression is higher in SCLE than in lupus tumidus and discoid lupus [3]. Additionally, local balances between effector or regulatory T cells and CXCL10 have been proposed [13,17].

Herein, we also corroborated increased expression of CXCL10 in all the SLE groups (with or without CLE) compared with the healthy donor group, but this expression was highest in the DLE group. The expression of CXCR3 was similar in the SLE groups (with or without CLE).

Moreover, a Th1-associated chemokine receptor profile was

observed by Freutel and colleagues, who showed that the CCR5+ / CCR3 + T helper cell ratio in patients with CLE correlated with disease activity [4]. Similarly, patients with SLE and cutaneous involvement had higher serum levels of CXCL16 than SLE patients without skin features. This chemokine is upregulated by Th1 cytokines, including IFN- γ , TNF- α , and IL-18 [18]. In addition, in this study, we demonstrated that CCR2 and CXCR5 expression is an important determinant of Th1 cell differentiation and migration into the skin of SLE/DLE patients, as was previously shown by Kim et al. and Morita et al. [19,20]. Likewise, it has been demonstrated that CCR2 contributes to defining T cell polarization to enrich major subsets of Th1 versus Th2 cells in inflamed tissues [19], which reinforces the absence of correlations between Th2 cells and CCL2/CCR2. On the other hand, CXCR5 + Th1 cells lack the capacity to induce naïve B cells to produce immunoglobulins via IL-21 [20]. In our patients, whether CXCR5 + / CD4 + T cells represent a circulating pool of memory Tfh cells that can be differentiated into Th1, Th2, and Th17 cell subsets with different capacities to regulate B cell responses, as previously reported by Morita et al., remains unclear [20].

Th17 cells produce IL-17, which stimulates T cells; increases the production of autoantibodies, inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, and IL-22) and chemokines (CCL2, CCL7, CCL20, CXCL1 and CXCL5); and induces neutrophil recruitment through chemokine regulation [21]. As other authors have shown, we found a high number of peripheral and tissue-infiltrating IL-17A-expressing CD4 T cells in the SLE/DLE and SLE/SCLE patients [22,23]. As Reiss et al. showed, we found that the chemoattraction of circulating CD4 + / CD161 + / IL-17A + cells to the skin in SLE/DLE patients preferentially depends on the expression of CCL17 [24]. We also determined that the migration of IL-17A-expressing CD4 T cells into the skin in SLE/DLE patients but not in SLE/SCLE patients is dependent on the expression of CXCR3 but is independent of CCL2.

On the other hand, a higher CD4 + / IL-22 + cell percentage in CLE tissue in comparison to healthy tissue as well as negative correlations of tissue and peripheral CD4 + / CD161 - / IL-22 + cell percentages with the CLASI score have been recognized [8]. In line with these findings, a study identified that SLE patients with skin involvement also have higher frequencies of CCR6 + / CD4 + / IL-22 + cells. Moreover, the IL-22-producing cell frequency is positively correlated with disease severity and negatively correlated with C3 serum levels [25].

We evaluated the expression of CCR4 and did not observe any differences among the groups. However, CCL17 was expressed at lower levels in the SLE/DLE and SCLE groups than in the SLE w/o CD and healthy control groups. CCL17 is synthesized by activated keratinocytes, DCs, and endothelial cells in the skin [26,27], while CCR4 is expressed by Langerhans cells, endothelial cells and fibroblasts. The interaction between CCL17 and CCR4 plays a critical role in classical-type activation of macrophages [28]. A previous study by Reiss et al. showed that both CCL27 and CCL17 can support the homing of T cells to the skin [24,29]. As Reiss et al. observed, we found that the chemoattraction of circulating CD4 + / CD161 - / IL-22 + cells to the skin in SLE/DLE patients preferentially depends on the expression of CCL17. On the other hand, CCR4 is reported to be necessary for CD4 T cell entry into inflamed skin [30], while other works have shown that CD4 and CD8 T cell infiltration does not require CCR4 and instead may depend on CCR10 [24] or CXCR3 and CCR5 [31]. We determined that the recruitment of the circulating CD4 + / CD161 - / IL-22 + cell subset into the skin of SLE/SCLE patients seems to be independent of CCR4.

B cells act as antigen-presenting cells and autoantibody producers, and these cells are in the peripheral blood and lesioned skin of patients with SLE/DLE [32]. Nonetheless, newly identified IL-10-producing B cells or regulatory B (Breg) cells with an immunosuppressive phenotype support immunological tolerance. Through the production of IL-10, IL-35, and transforming growth factor β (TGF- β), Bregs suppress immunopathology by prohibiting the expansion of pathogenic T cells and other proinflammatory lymphocytes [33]. B cell migration to sites of

inflammation is mediated by CXCL13, a B cell-attracting chemokine whose receptor is CXCR5, which is normally expressed on mature B cells and follicular T helper cells. In some clinical studies, the serum levels of this chemokine were increased in patients with SLE and correlated with disease activity and lupus nephritis [34,35]. Herein, we observed that the expression of CXCL13 was higher in the skin of the SLE w/o CD patients than in that of the SLE/SCLE patients. However, its receptor CXCR5 was more highly expressed in the SLE/DLE group than in the SLE/SCLE group. However, we showed that the trafficking of IL-10-producing B cells into the skin of SLE/SCLE patients is dependent on the expression of CXCR5 and chemoattraction by CXCL13.

However, cumulative evidence suggests that chemokines play a role in the pathogenesis of pain and itch [36,37]. CCL2, also called MCP 1, is a major inflammatory chemokine and is specifically responsible for recruiting monocytes and basophils to the site of inflammation in the skin lesions of SLE patients [38]. It binds to CCR1, CCR2, and CCR4 to exert distinct biological functions. Evidence indicates that CCL2/CCR2 signaling is essential for the development of pain and itch [39]. We found higher levels of CCL2/CCR2 in the skin of the patients with SLE and SLE/CLE than in the skin of the healthy donors. By means previously reported by Liu T et al. and Liou J-T et al., we also determined positive correlations in the SLE/SCLE patients between pain and CCL2 or CCR6 expression [36–39].

Additionally, we also found that the migration of not only IFN- γ -producing CD4 T cells in SLE/DLE but also Foxp3-expressing CD4 T cells in SLE/SCLE depends on the expression of CCR2 [19,40].

CXCL8 is a chemotactic leukocyte/neutrophil-recruiting and leukocyte/neutrophil-activating molecule that primarily acts on neutrophils but can also affect other granulocytes and induce phagocytosis. Anti-IL-8 neutralizing antibody administration prevents neutrophil-dependent tissue damage as well as neutrophil infiltration and, consequently, acute inflammation in LPS-induced dermatitis [41].

We found higher expression of CXCR1 in the SLE/DLE, SLE/SCLE and SLE w/o CD groups than in the healthy control group, with the highest expression in the SLE/DLE group. Conversely, there were no significant differences in the expression of CXCL8.

In our SLE/DLE patients, skin damage was related to CXCL8 expression, based on the positive correlation between the chemokine and CLASI damage score. Moreover, we determined that the migration of Foxp3-expressing CD4 T cells in SLE/SCLE patients depends on the expression of CXCR1, while pDCregs in SLE/DLE patients correlate with the expression of CCR10. However, the levels of CXCR1 and CCR10 in the skin of these patients were not sufficient to modulate the tissue damage due to the imbalance between effectors and regulators [41–43].

In conclusion, the immune response is more vigorous in patients with SLE/DLE than in those with SLE/SCLE. However, the correlations between chemokine/receptor expression and subpopulations of effector/regulatory T cells, B cells and pDCs showed differential responses among these cutaneous pathologies (Fig. 5).

5. Author disclosure statement

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

This study was financially supported by, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico. Silvia Mendez Flores is a student of the PhD program: Programa de Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de México.

Authors' Contributions

S.M-F., J.F-C. and G.H-M. Study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript,

critical revision of the manuscript for important intellectual content, statistical analysis, obtained funding, technical support. J.Z. Study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript for important intellectual content, statistical analysis, technical support. D.A.-Ll. And J.R.-D. Acquisition of data, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript for important intellectual content, technical support.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.03.010>.

References

- [1] M. Baltaci, P. Fritsch, Histologic features of cutaneous lupus erythematosus, *Autoimmun. Rev.* 8 (6) (2009) 467–473.
- [2] M. Sharma, Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease, *Crit. Rev. Biotechnol.* 30 (1) (2010) 1–22.
- [3] T. Gambichler, Z. Genc, M. Skrygan, et al., Cytokine and chemokine ligand expression in cutaneous lupus erythematosus, *Euro. J. Dermatol.* 22 (3) (2012) 319–323.
- [4] S. Freutel, E. Gaffal, S. Zahn, T. Bieber, T. Tüting, J. Wenzel, Enhanced CCR5+ / CCR3+ T helper cell ratio in patients with active cutaneous lupus erythematosus, *Lupus* 20 (12) (2011) 1300–1304.
- [5] M.C. Hochberg, Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 40 (9) (1997) 1725.
- [6] J. Albrecht, L. Taylor, J.A. Berlin, et al., The CLASI (Cutaneous lupus erythematosus disease area and severity index): an outcome instrument for cutaneous lupus erythematosus, *J. Invest. Dermatol.* 125 (5) (2005) 889–894.
- [7] D.D. Gladman, D. Ibañez, M.B. Urowitz, Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000, *J. Rheumatol.* 29 (2002) 288–291.
- [8] S. Méndez-Flores, G. Hernández-Molina, A.B. Enríquez, et al., Cytokines and effector/regulatory cells characterization in the physiopathology of cutaneous lupus erythematosus: a cross-sectional study, *Mediat. Inflamm.* 2016 (2016) (2016) 7074829.
- [9] J.C. Achtman, V.P. Werth, Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus, *Arthritis Res. Therapy* 17 (2015) 182.
- [10] S. Meller, F. Winterberg, M. Gilliet, et al., Ultraviolet radiation induced injury, chemokines and leukocyte recruitment: an amplification cycle triggering cutaneous lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 52 (5) (2005) 1504–1516.
- [11] J. Morales, B. Homey, A.P. Vicari, et al., CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, pp. 14470–14475 25.
- [12] J. Wenzel, J. Proelss, A. Wiechert, S. Zahn, T. Bieber, T. Tüting, CXCR3-mediated recruitment of cytotoxic lymphocytes in lupus erythematosus profundus, *J. Am. Acad. Dermatol.* 56 (4) (2007) 648–650.
- [13] J.R. Groom, A.D. Luster, CXCR3 in T cell function, *Exp. Cell Res.* 317 (5) (2011) 620–631.
- [14] O.M. Steinmetz, J.E. Turner, H.J. Paust, et al., CXCR3 mediates renal Th1 and Th17 immune response in murine lupus nephritis, *J. Immunol.* 183 (7) (2009) 4693–4704.
- [15] K.E. Cole, C.A. Strick, T.J. Pradis, et al., Interferon inducible T cell alpha chemoattractant: a novel non-ELF CXC chemokine with potent activity on activated T cell through selective high affinity binding to CXCR3, *J. Exp. Med.* 187 (12) (1988) 2009–2021.
- [16] J. Flier, D. Boorsma, P. van Beek, et al., Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation, *J. Pathol.* 94 (4) (2001) 398–405.
- [17] E.A. Heller, E. Liu, A.M. Tager, et al., Chemokine CXCL10 promotes atherosclerosis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells, *Circulation* 113 (19) (2006) 2301–2312.
- [18] M. Qin, Y. Guo, L. Jiang, X. Wang, Elevated levels of serum sCXCL16 in systemic lupus erythematosus; potential involvement in cutaneous and renal manifestations, *Clin. Rheumatol.* 33 (11) (2014) 1595–1601.
- [19] C.H. Kim, L. Rott, E.J. Kunkel, et al., Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo, *J. Clin. Invest.* 108 (9) (2001) 1331–1339.
- [20] R. Morita, N. Schmitt, S.E. Bentebibel, et al., Human blood CXCR5(+) JCD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion, *Immunity* 34 (1) (2011) 108–121.
- [21] V. Dardalhon, T. Korn, V.K. Kuchroo, A.C. Anderson, Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity, *J. Autoimmun.* 31 (3) (2008) 252–256.
- [22] C. Tanasescu, E. Balancescu, P. Balancescu, et al., IL-17 in cutaneous lupus erythematosus, *Euro. J. Internal Med.* 21 (3) (2010) 202–207.
- [23] N. Mikita, T. Ikeda, M. Ishiguro, F. Furukawa, Recent advances in cytokines in cutaneous and systemic lupus erythematosus, *J. Dermatol.* 38 (9) (2011) 839–849.
- [24] Y. Reiss, A.E. Proudfoot, C.A. Power, J.J. Campbell, E.C. Butcher, CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin, *J. Exp. Med.* 194 (10) (2001) 1541–1547.
- [25] W. Zhong, Y. Jiang, H. Ma, et al., Elevated levels of CCR6⁺T helper 22 cells correlates with skin and renal impairment in systemic lupus erythematosus, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 12962.
- [26] J.J. Campbell, G. Haraldsen, G.J. Pan, et al., The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells, *Nature* 400 (1999) 776–780.
- [27] J.J. Campbell, E.C. Butcher, Chemokines in tissue-specific and microenvironment specific lymphocyte homing, *Curr. Opin. Immunol.* 12 (3) (2000) 336–341.
- [28] M. Inngjerdingen, B. Damaj, A.A. Maghazachi, Human NK cells express CC chemokine receptors 4 and 8 and respond to thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine, and I-309, *J. Immunol.* 164 (8) (2000) 4048–4054.
- [29] B. Homey, H. Alenius, A. Müller, et al., CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation, *Nat. Med.* 8 (2) (2002) 157–165.
- [30] J.J. Campbell, D.J. O'Connell, M.A. Wurbel, Cutting edge: chemokine receptor CCR4 is necessary for antigen-driven cutaneous accumulation of CD4⁺ T cells under physiological conditions, *J. Immunol.* 178 (6) (2007) 3358–3362.
- [31] R.K. Gregg, L. Nichols, Y. Chen, B. Lu, V.H. Engelhard, Mechanisms of spatial and temporal development of autoimmune vitiligo in tyrosinase-specific TCR transgenic mice, *J. Immunol.* 184 (4) (2010) 1909–11017.
- [32] C.H. Wouters, C. Diegenant, J.L. Ceuppens, H. Degreef, E.A. Stevens, The circulating lymphocyte profiles in patients with discoid lupus erythematosus and systemic lupus erythematosus suggest a pathogenetic relationship, *British J. Dermatol.* 150 (4) (2004) 693–700.
- [33] I.U. Egbuniwe, S.N. Karagiannis, F.O. Nestle, K.E. Lacy, Revisiting the role of B cells in skin immune surveillance, *Trends Immunol.* 36 (2) (2015) 102–111.
- [34] L. Schiffer, K. Worthmann, H. Haller, M. Schiffer, CXCL13 as a new biomarker of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis-from bench to bedside? *Clin. Exp. Immunol.* 179 (1) (2015) 85–89.
- [35] C.K. Wong, P.T. Wong, L. Tam, E.K. Li, D.P. Chen, C.W. Lam, Elevated production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity, *J. Clin. Immunol.* 30 (1) (2010) 45–52.
- [36] T. Liu, R.R. Ji, New insights into the mechanisms of itch: are pain and itch controlled by distinct mechanisms? *Pflugers Archiv: Euro. J. Physiol.* 465 (12) (2013) 1671–1685.
- [37] J.T. Liou, C.M. Lee, Y.J. Day, The immune aspect in neuropathic pain: role of chemokines, *Acta Anaesthesiol. Taiwan.* 51 (3) (2013) 127–132.
- [38] Q. Pan, Y. Feng, Y. Peng, et al., Basophil recruitment to skin lesions of patients with systemic lupus erythematosus mediated by CCR1 and CCR2, *Cell. Physiol. Biochem.: Int. J. Exp. Cell. Physiol., Biochem., Pharmacol.* 43 (2) (2017) 832–839.
- [39] C. Abbadié, S. Bhangoo, Y. De Koninck, et al., Chemokines and pain mechanisms, *Brain Res. Rev.* 60 (1) (2009) 125–134.
- [40] N. Zhang, B. Schröppel, G. Lal, et al., Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissue to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response, *Immunity* 30 (3) (2009) 458–469.
- [41] A. Harada, N. Sekido, T. Akahoshi, et al., Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation, *J. Leukoc. Biol.* 56 (5) (1994) 559–564.
- [42] S. Eikawa, Y. Ohue, K. Kitaoka, et al., Enrichment of Foxp3+ CD4 regulatory T cells in migrated T cells to IL-6- and IL-8-expressing tumors through predominant induction of CXCR1 by IL-6, *J. Immunol.* 185 (11) (2010) 6734–6740.
- [43] V. Sisirak, N. Vey, B. Vanbervliet, et al., CCR6/CCR10-mediated plasmacytoid dendritic cell recruitment to inflamed epithelia after instruction in lymphoid tissues, *Blood* 118 (19) (2011) 5130–5140.

Research Article

MicroRNA Expression in Cutaneous Lupus: A New Window to Understand Its Pathogenesis

Silvia Méndez-Flores,¹ Janette Furuzawa-Carballeda ,² Gabriela Hernández-Molina ,² Gustavo Ramírez-Martínez,^{3,4} Nora E. Regino-Zamarrípa,³ Blanca Ortiz-Quintero,⁵ Luis Jiménez-Alvarez,³ Alfredo Cruz-Lagunas ,³ and Joaquín Zúñiga ,^{3,4}

¹Department of Dermatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

²Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

³Laboratory of Immunobiology and Genetics, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

⁴Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Mexico City, Mexico

⁵Department of Biochemistry, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to Janette Furuzawa-Carballeda; jfuruzawa@gmail.com and Joaquín Zúñiga; joazu@yahoo.com

Academic Editor: Carla Pagliari

Copyright © 2019 Silvia Méndez-Flores et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. The role of miRNAs in the pathogenesis of cutaneous lupus has not been studied. **Objective.** It was to assess the levels of a selected panel of circulating miRNAs that could be involved in the regulation of the immune response, inflammation, and fibrosis in cutaneous lupus. **Methods.** It was a cross-sectional study. We included 22 patients with subacute (SCLE) and 20 with discoid (DLE) lesions, and 19 healthy donors (HD). qRT-PCR for miRNA analysis, flow cytometry in peripheral blood, and skin immunohistochemistry were performed to determine the distribution of CD4⁺ T cells and regulatory cells and their correlation with circulating miRNAs. **Results.** miR-150, miR-1246, miR-21, miR-23b, and miR-146 levels were downregulated in SCLE vs. HD. miR-150, miR-1246, and miR-21 levels were downregulated in DLE vs. HD. Peripheral CD4⁺/CD25^{hi}/IL-4⁻ cells and CD4⁺/CD25^{hi}/Foxp3⁺ were negatively associated with miR-23b, and CD4⁺/CD25^{hi}/IFN- γ ⁺ with miR-1246 in SCLE, whereas CD123⁺/CD196⁺/IDO⁺ cells were positively associated with miR-150 in DLE. In the tissue, CD4⁺/IL-4⁺ and CD20⁺/IL-10⁺ cells were positively associated with miR-21 and CD4⁺/IFN- γ ⁺ with miR-31 in SCLE, whereas CD4⁺/IL-4⁺ cells were positively associated with miR-150, and CD20⁺/IL-10⁺ cells with miR-1246 and miR-146a in DLE. In the SCLE, lower miR-150 levels were correlated with higher CLASI scores. The KEGG pathway enrichment analysis revealed that cell cycle regulation pathways, p53, TGF- β , thyroid hormone, and cancer signaling pathways were shared between miR-21, miR-31, miR-23b, miR-146a, miR-1246, and miR-150. **Conclusions.** A downregulation of miR-150, miR-1246, and miR-21 in both CLE varieties vs. HD was determined.

1. Introduction

Cutaneous lupus erythematosus (CLE) is an autoimmune condition that comprehends a wide range of dermatological manifestations and clinical phenotypes. Its pathogenesis is multifactorial and involves genetic predisposition, environmental factors (ultraviolet light B), and abnormalities in the

innate and adaptive immune response. In this context, the participation of some proinflammatory cytokines such as IFN- α , IL-1, IL-6, and TNF- α has been also recognized [1, 2]. Histological analysis of CLE skin is characterized by a dense periadnexal and perivascular lymphocytic infiltrate, mainly composed by CD4⁺ helper T cells, CD8⁺ cytotoxic T cells, B cells, and macrophages [1]. Moreover, the

participation of Th17 and Th22 CD4⁺ T cells as well as regulatory T cells has been recently described [3, 4]. In addition, the activation of pathways via pattern recognition receptor (PRR) signaling, Janus kinase- (JAK-) signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling, and nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling also have a role in CLE [5].

Recent studies have revealed the potential contribution of microRNAs (miRNAs) in diverse autoimmune diseases [6]. miRNAs are a class of small noncoding RNAs that modulate gene expression at the posttranscriptional level. They bind to the target messenger RNA, leading either to translational repression or to degradation. miRNAs regulate diverse physiologic processes, and their dysregulation can result in aberrant responses including impaired immune function [6–8].

For instance, in systemic lupus erythematosus (SLE), miRNA expression has been detected in the plasma [9], serum [10], urine, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [11]. Diverse miRNA patterns have been associated with a certain feature such as renal involvement (miR-146a), childhood onset (miR-516a-3p, miR-629, and miR-525-5p), and overall disease activity (miR-21 and miR-146a) [9–11] and recently, in discoid lupus (DLE) (miR-31 and miR-485-3p) [12]. Indeed, a study suggested miR-29b as a potential SLE diagnostic biomarker. The authors in that study, using a ROC curve analysis, showed an AUC of 0.75 (95% CI 0.64–0.86) for diagnosing SLE [13].

On the other hand, research focused on understanding the role of miRNAs in the regulation of signaling pathways may lead to develop new biomarkers and new therapeutic approach. In this sense, circulating miR-29b was also proposed as a biomarker to estimate lupus activity as it positively correlated with the SLEDAI score and anti-dsDNA titer and inversely correlated with complement C3 level and clinical response after treatment [13].

Herein, we hypothesized that the expression of a circulating miRNA signature might distinguish CLE patients and its subtypes. Therefore, our main objective was to evaluate the circulating levels of a selected panel of miRNAs based on their possible participation in the regulation of the immune response, inflammation, and fibrosis among patients with CLE. Specifically, we evaluated the following miRNAs: miR-29 family that regulates T cell polarization [14]; miR-150 involved in B and Th17 cell differentiation and TGF- β signaling [15]; miR-23b related to IL-17, TNF- α , and IL-1 β expression [16]; miR-1246 which is associated to B cell activation [17]; miR-21 linked with Th2 and Th17 differentiation and Foxp3⁺ expression [18]; miR-31 that regulates Treg cells, NF- κ B activation, and fibrosis [19]; miR-146 that appears to downregulate NF- κ B and TLR/MyD88 proinflammatory signal pathways [20, 21]; miR-155 that contributes to Th1 and Th17 differentiation [22]; miR-485 that participates in Th2 differentiation [12]; and miR-197 that allows the IL-22 responses [23]. Moreover, we also correlated these serum miRNAs with T, B, and regulatory cell subpopulations in the skin tissue and peripheral blood as well as with the CLASI activity score. Finally, we elucidated their possible participation in CLE pathogenesis applying bioinformatics.

2. Materials and Methods

2.1. Patients. This was a cross-sectional study conducted in a tertiary care center. We included 42 consecutive patients with CLE: 22 with subacute cutaneous lupus (SCLE) and 20 with DLE. To be eligible, patients also had to meet the classification criteria for SLE according to the ACR criteria [24] and to have an active lupus-specific lesion compatible with SCLE or DLE. The diagnosis of CLE was established in consensus by a rheumatologist and a dermatologist, as well as by biopsy. In addition, patients should not be under topical treatment including steroids within the last 6 weeks. However, patients could maintain their basal oral steroids and immunosuppressants. Patients were excluded if they had any concomitant cutaneous lesion not attributed to lupus or an overlap autoimmune condition.

We included 19 healthy donors (HD) as controls. The control group did not have any autoimmune disease and/or concurrent infection and did not receive prednisone or immunosuppressants.

We measured the CLASI, a validated index to quantify disease severity [25]. As this instrument measures both activity and damage, for the present study, we only used the activity domain that ranges from 0 to 70 (higher scores are indicative of more severity).

In addition, patients' clinical records were carefully reviewed according to a preestablished protocol to collect demographics as well as other clinical and serologic features.

2.2. Skin Samples. Skin punch biopsies (4 mm diameter) were performed, fixed in formalin, and evaluated with hematoxylin-eosin staining for the assessment of classic histologic cutaneous lupus features. Then, the rest of the specimen was stored for immunohistochemistry. Microscopic review was performed in a blinded manner to the diagnosis by one blinded observer.

Overall, most of the cutaneous lupus biopsies corresponding to photoexposed areas localized at the arms, thorax, or scalp. Control tissue biopsies were also taken from photoexposed areas and, if possible, from the same anatomical zone.

2.3. Immunohistochemistry. We followed the methods of Méndez-Flores et al. [26]. Briefly, IL-22-expressing cells were determined in 4 μ m thick sections of tissue. After deparaffinization and demasking of antigens, tissues were blocked with 3% H₂O₂. Then, nonspecific background staining was avoided with the IHC background blocker (Enzo Life Sciences). Tissues were incubated with goat polyclonal anti-human IL-22 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 10 μ g/ml. Binding was identified with biotinylated donkey anti-goat IgG antibody (ABC Staining System; Santa Cruz Biotechnology). Slides were incubated with horseradish peroxidase- (HRP-) streptavidin, followed by incubation with the peroxidase substrate 3,3-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich) for 10 min. The sections were counterstained with hematoxylin. Negative control staining was performed with normal human serum diluted 1:100, instead of primary antibody, and the IHC universal negative

control reagent (IHC universal negative control reagent, Enzo Life Sciences). The reactive blank was incubated with phosphate buffer saline-egg albumin (Sigma-Aldrich) instead of the primary antibody. Both controls excluded nonspecific staining or endogenous enzymatic activities [26]. Spleen and ganglion samples were used as a positive control (Figure S1).

2.4. Double-Staining Procedure. We followed the methods of Méndez-Flores et al. [26]. To determine the subpopulation of CD4⁺/IL-17A⁺-, CD4⁺/IL-4⁺-, CD4⁺/IFN- γ ⁺-expressing T cells, CD25⁺/Foxp3⁺ regulatory T cells, CD20⁺/IL-10⁺-producing B cells, and CD123⁺/IDO⁺ pDC cell subpopulations, a simultaneous detection was performed (MultiView (mouse-HRP/rabbit-AP) Enzo Life Sciences). After deparaffinization and demasking of antigens with the antigen retrieval reagent (Enzo Life Sciences), tissues were blocked with 3% H₂O₂. The procedure is a sequential double staining where the first antigen (normal serum as negative control, rabbit polyclonal anti-IL-17A, anti-IL-4, anti-IFN- γ , anti-IDO IgG antibody, or mouse monoclonal anti-IL-10 or anti-Foxp3 IgG₁ antibody (Santa Cruz Biotechnology) at 10 μ g/ml) was visualized using horseradish peroxidase (HRP)/3'3'-diaminobenzidine (DAB) and the second antigen (normal serum as negative control or second primary rabbit polyclonal anti-CD20, anti-CD25 IgG antibody or mouse monoclonal anti-CD4, anti-IgG₁ antibody (Santa Cruz Biotechnology), or anti-CD123 IgG antibody (Abcam plc, CA, UK) at 10 μ g/ml) was visualized using alkaline phosphatase (AP)/Permanent Red. Tissues were counterstained with Mayer's hematoxylin and mounted in aqueous mounting medium. Cytokine-expressing cells as well as double positive cells were assessed by estimating the number of positively staining cells in two fields (X320) and were reported as the percentage of immunoreactive cells of the inflammatory infiltrates located at the epidermis and dermis. Results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of cells quantified by the program Image Pro Plus version 5.1-1 [26].

2.5. Peripheral Blood Samples. A venous blood sample was drawn from each subject to perform flow cytometry analysis and RNA isolation.

2.6. Flow Cytometry. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by gradient centrifugation on Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway). Cell pellet was resuspended in 1 ml RPMI at 1-2 $\times 10^6$ cell/ml, and cell suspension was treated with 2 μ l of a cell activation cocktail of phorbol-12myristate 13-acetate (40.5 μ M) and ionomycin (669.3 μ M) in DMSO (500x) and brefeldin A (BioLegend Inc., San Diego, CA, USA) for 6 hours at 37°C in a CO₂ incubator.

PBMCs were incubated with 5 μ l of Human TruStain FcX™ (BioLegend Inc.) per million cells in 100 ml PBS for 10 minutes, and then, they were labeled with 5 μ l of antihuman CD3-FITC-labeled, antihuman CD4-PeCy5-labeled, and antihuman CD161-APC-conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA); antihuman CD3-FITC-labeled, antihuman CD4-PeCy5-labeled, and antihu-

man CD25-APC-conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences); antihuman CD19-APC-labeled, antihuman CD24-FITC-conjugated, and antihuman CD38-PeCy5-labeled monoclonal antibodies (BD Biosciences); or antihuman CCR6-PerCP/Cy5.5-conjugated and antihuman CD123-FITC-labeled monoclonal antibodies (BD Biosciences) in separated tubes during 20 min at 37°C in the dark. Cells were permeabilized with 200 μ l of cytofix/cytoperm solution (BD Biosciences) at 4°C for 30 min. Intracellular staining was performed with an anti-human IL-22-PE-, IL-17A-PE-, IL-4-PE-, IFN- γ -PE-, Foxp3-PE-, IL-10-PE-, and IDO-PE-labeled mouse monoclonal antibodies (BD Biosciences) for 30 min at 4°C in the dark. An electronic gate was made for CD3⁺/CD4⁺/CD161⁻ cells, CD3⁺/CD4⁺/CD161⁺ cells, CD3⁺/CD4⁺/CD25⁻ cells, CD3⁺/CD4⁺/CD25^{hi} cells, CD19⁺/CD38^{hi}/CD24^{hi} cells, and CD123^{hi}/CD196⁺ cells. Results are expressed as the relative percentage of IL-22⁺, IL-17A⁺, IL-4⁺, IFN- γ ⁺, Foxp3⁺, IL-10⁺, and IDO⁺ expressing cells in each gate. As isotype control, IgG1-FITC/IgG1-PE/CD45-PeCy5 mouse IgG1 *kappa* (BD Tritest, BD Biosciences) was used to set the threshold and gates in the cytometer. We ran an unstained (autofluorescence control) and permeabilized PBMC sample. Autofluorescence control was compared to single-stained cell-positive controls to confirm that the stained cells were on scale for each parameter. Besides, BD Calibrate 3 beads were used to adjust instrument settings, set fluorescence compensation, and check instrument sensitivity (BD calibrates, BD Biosciences). Fluorescence minus one (FMO) controls were stained in parallel using the panel of antibodies with sequential omission of one antibody, except for the anti-IL-22, anti-IL-17A, anti-IL-4, anti-IFN- γ , anti-Foxp3, anti-IL-10, and anti-IDO antibody, which was replaced by an isotype control rather than simply omitted. Finally, T subsets were analyzed by flow cytometry with an Accuri C6 (BD Biosciences). A total of 500,000–1,000,000 events were recorded for each sample and analyzed with the FlowJo X software (Tree Star, Inc.) [26].

2.7. RNA Isolation and Quantitative Real-Time PCR Analyses of MicroRNAs. Total serum RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The concentration and quality of total RNA were measured by a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Waltham, Mass). To quantify miRNAs, cDNA was synthesized using a Mir-X miRNA first-strand synthesis kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was amplified by real-time PCR with a SYBR green-based fluorescent method using the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). U6 was used as an endogenous control to normalize the expression values. We chose the following panel of miRNAs, for their effect reported in the literature in the different regulatory cells studied here. Primer sequences used for real-time PCR were as follows: hsa-miR-21-5p, 5'-TAGC TTATCAGACTGATGTTGA-3'; hsa-miR-29a, 5'-TAGC ACCATCTGAAATCGGTTA-3'; hsa-miR-29b, 5'-TAGC

ACCATTTGAAATCAGTGTT-3'; hsa-miR23b, 5'-TGGG TTCCTGGCATGCTGATTT-3'; hsa-miR-31, 5'-AGGC AAGATGCTGGCATAGCT-3'; hsa-miR-146a, 5'-TGAG AACTGAATTCCATGGGTT-3'; hsa-miR-155, 5'-TTAA TGCTAATCGTGATAGGGGT-3'; hsa-miR-150, 5'-TCTC CCAACCCTTGTACCAGTG-3'; hsa-miR-1246, 5'-AATG GATTTTTGGAGCAGG-3'; hsa-miR-197-3p, 5'TTCACC ACCTTCTCCACCCAGC-3'; hsa-miR-485-p, 5'AGAGGC TGGCCGTGATGAATTC-3'; and U6 forward, 5'-GCTT CGGCAGCACATATACTAAAAT-3' and U6 reverse, 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'.

qRT-PCR assays were performed in a StepOne real-time PCR instrument (Life Technologies, Foster City, CA). The reactions were carried out with a 10 min incubation at 95°C followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All reactions were run in triplicate, and the average threshold cycle and SD values were calculated. The transcript levels were calculated based on the threshold cycle (C_t) using the delta-delta C_t method that measures the relative of a target RNA between two samples by comparing them to a normalization control RNA (U6).

2.8. Target Gene and Pathway Enrichment Analysis. We determined the gene targets of identified miRNAs using DIANA-TarBase v8 (<http://www.microrna.gr/tarbase>), which is a database containing experimentally validated miRNA-target interactions. We used DIANA-miRPath v3.0 (<http://www.microrna.gr/miRPathv3>) and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database for the identification of the networks and pathway enrichment of the selected miRNA target genes. Enriched pathways showing statistical significance ($P \leq 0.05$) were subjected to further molecular analysis and interactome network construction. Interactome networks were constructed to connect miRNAs to their putative target genes (or to enrichment pathways) within the selected enriched pathways; the resulting networks were exported to Cytoscape v3.1.0 (<http://cytoscape.org/index.php>) for visualization.

2.9. Ethical Considerations. This work was performed according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The study was approved (Reference 822) by the Ethical Committee from the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, and a written informed consent was obtained from all subjects.

2.10. Statistical Analysis. Descriptive statistic was performed, and categorical variables were compared using the Chi-2 test or Fisher's exact test. We used Mann-Whitney U -test for comparison of two medians. One-way analysis of variance on ranks Kruskal-Wallis, if the Kruskal-Wallis test was significant, a post hoc analysis (Dunn's test) was performed for all pairwise multiple comparison procedures. The relative expression of miRNAs was reported as medians and ranges (5th/95th percentiles). We reported nonparametric correlations using Spearman coefficients among serological relative expression of miRNAs and CLASI score. A strong correlation was defined as a Spearman coefficient between ± 0.50 and ± 1 ,

a medium correlation between ± 0.30 and ± 0.49 , and a weak correlation below 0.29. We also performed a multiple linear regression analysis to evaluate the possible association of the meaningful miRNAs and the peripheral and skin cell subpopulations among CLE varieties.

All the statistical tests were performed 2-sided; P values less than 0.05 were considered statistically significant. SPSS (v. 21.0) and GraphPad Prism (v. 5) software was used for statistical analysis.

3. Results

3.1. Clinical and Demographic Characteristics. Clinical and demographic characteristics of the groups are summarized in Table 1. Most of the participants were females and had a similar age. We did not find significant differences regarding SLE duration, prednisone dose, and use of antimalarials and immunosuppressants among the groups with CLE. However, as expected, the median of the CLASI activity score in SCLE patients was higher than the score of DLE patients.

3.2. miRNA Profiling in SCLE and DLE Patients. The analysis revealed differential circulating levels of six miRNAs (miR-150, miR-23b, miR-1246, miR-21, miR-31, and miR-146) among the patients' groups and controls (Figure 1). In this regard, circulating levels of miR-1246 (372.7-fold decrease), miR-150 (183.1-fold decrease), miR-21 (14.7-fold decrease), miR-23b (14-fold decrease), and miR-146 (13-fold decrease) were considerably lower in patients with SCLE than in healthy controls. Patients with DLE also had lower levels of miR-21 (4.6-fold decrease), miR-1246 (3.8-fold decrease), and miR-150 (1.7-fold decrease) than healthy controls. When we compared the group with SCLE versus DLE, the SCLE group had lower levels of miR-1246 (75.5-fold decrease), miR-146 (40.6-fold decrease), and miR23b (23.2-fold decrease).

3.3. Correlation between miRNAs and CLASI Activity Score. Except for miR-150 in the subgroup of patients with SCLE ($\rho = -0.64$ CI 95% -0.78 to -0.11, $P = 0.01$), we did not find any correlation among the CLASI activity score and other circulating miRNA levels.

3.4. Associations of miRNAs and Circulating and Skin Cell Subpopulations. We performed a multiple regression analysis to evaluate the association of the different miRNAs and the circulating and skin cell subsets.

At peripheral blood, in the group of SCLE, we observed a negative association with $CD4^+/CD25^-/IL-4^+$ cells and $CD4^+/CD25^{hi}/Foxp3^+$ and miR-23b (Figures 2(a), 2(e), and 2(g), Table 2) and $CD4^+/CD25^-/IFN-\gamma^+$ with miR-1246 (Figures 2(a) and 2(f), Table 2). In the group of DLE patients, there was a positive association with $CD123^+/CD196^+/IDO^+$ plasmacytoid dendritic cells with miR-150 (Figures 2(b) and 2(i), Table 3).

At the skin, in the group of SCLE, a positive association was determined between miR-21 and $CD4^+/IL-4^+$ (Figure 3(c), Table 2); and $CD20^+/IL-10^+$ (Figure 3(f), Table 2) and $CD4^+/IFN-\gamma^+$ with miR-31 (Figure 3(d), Table 2). In the DLE patients' group, $CD4^+/IL-4^+$ cells were

TABLE 1: Clinical characteristics from patients with cutaneous lupus erythematosus.

	Cutaneous lupus erythematosus		Healthy donor <i>n</i> = 19	<i>P</i> value
	SCLE <i>n</i> = 22	DLE <i>n</i> = 20		
<i>Demographics</i>				
Age (years)				
Mean ± SD	38.2 ± 13.6	37.4 ± 15.3	43.6 ± 16.5	
Median	34.5	32.5	45.0	
Range	(20-62)	(18-74)	(21-76)	
Sex, females, (%)				
	95.5	95	95	
Disease duration (years)				
Mean ± SD	10.2 ± 10.3	7.5 ± 6.4	–	
Median	6.0	7.0		
Range	(1-41)	(1-26)		
<i>Laboratory variables</i>				
Hemoglobin (g/dl)				
Mean ± SD	12.6 ± 2.0	13.4 ± 1.5	14.4 ± 1.0	
Median	13.0	13.2	14.5	
Range	(9.3–15.8)	(11.2–16.5)	(12.5–15.8)	
Leucocytes (cells/ μ l)				
Mean ± SD	4905 ± 1951	4944 ± 1311	5649 ± 2102	
Median	4900	4900	5500	
Range	(1700–9100)	(2400–7000)	(1140–8200)	
Lymphocytes (%)				
Mean ± SD	19.1 ± 7.44	21.9 ± 5.2	30.4 ± 10.6	
Median	19.0	22.7	29.9	
Range	(8.0–33.0)	(14.9–33.5)	(18.1–47.2)	
Monocytes (%)				
Mean ± SD	9.3 ± 3.7	7.7 ± 2.6	6.8 ± 2.7	
Median	9.1	8.2	6.7	
Range	(4.4 – 15.0)	(3.0 – 13.1)	(1.0 – 10.3)	
Neutrophils (%)				
Mean ± SD	70.6 ± 8.3	68.1 ± 6.5	59.4 ± 10.7	
Median	72.6	67.6	62.5	
Range	(53.0–82.7)	(53.6–8.8)	(43.5–73.3)	0.003

TABLE 1: Continued.

	Cutaneous lupus erythematosus		Healthy donor <i>n</i> = 19	<i>P</i> value
	SCLE <i>n</i> = 22	DLE <i>n</i> = 20		
Platelets (x10 ³ cells/ μ l)				
Mean \pm SD	191.6 \pm 83.1	204.9 \pm 49.4	241.8 \pm 34.9	
Median	205.0	223.5	249.0	
Range	(30–360)	(128–276)	(192–306)	
C3 (mg/dl)			–	
Mean \pm SD	73.2 \pm 31.8	82.3 \pm 28.1		
Median	68.5	78.7		
Range	(29.4–130.4)	(28.8–132.4)		
C4 (mg/dl)			–	
Mean \pm SD	16.4 \pm 9.9	15.2 \pm 5.9		
Median	13.5	14.3		
Range	(5.9–37.2)	(6.0–29.0)		
Anti-dsDNA (IU/ml)			–	
Mean \pm SD	135.6 \pm 188.3	234.4 \pm 363.5		
Median	49.0	12.5		
Range	(12.3–570.0)	(7.7–1116.7)		
<i>Clinical variables</i>				
CLASI activity score			–	0.01
Mean \pm SD	20.9 \pm 8.2	13.4 \pm 6.3		
Median	20.0	12.5		
Range	(9–37)	(2–29)		
<i>Treatment</i>				
Antimalarial (%)	14 (63.6)	13 (65)	–	
Prednisone (mg/day)	10	15	–	
Immunosuppressants (%)	13 (59)	12 (60)	–	

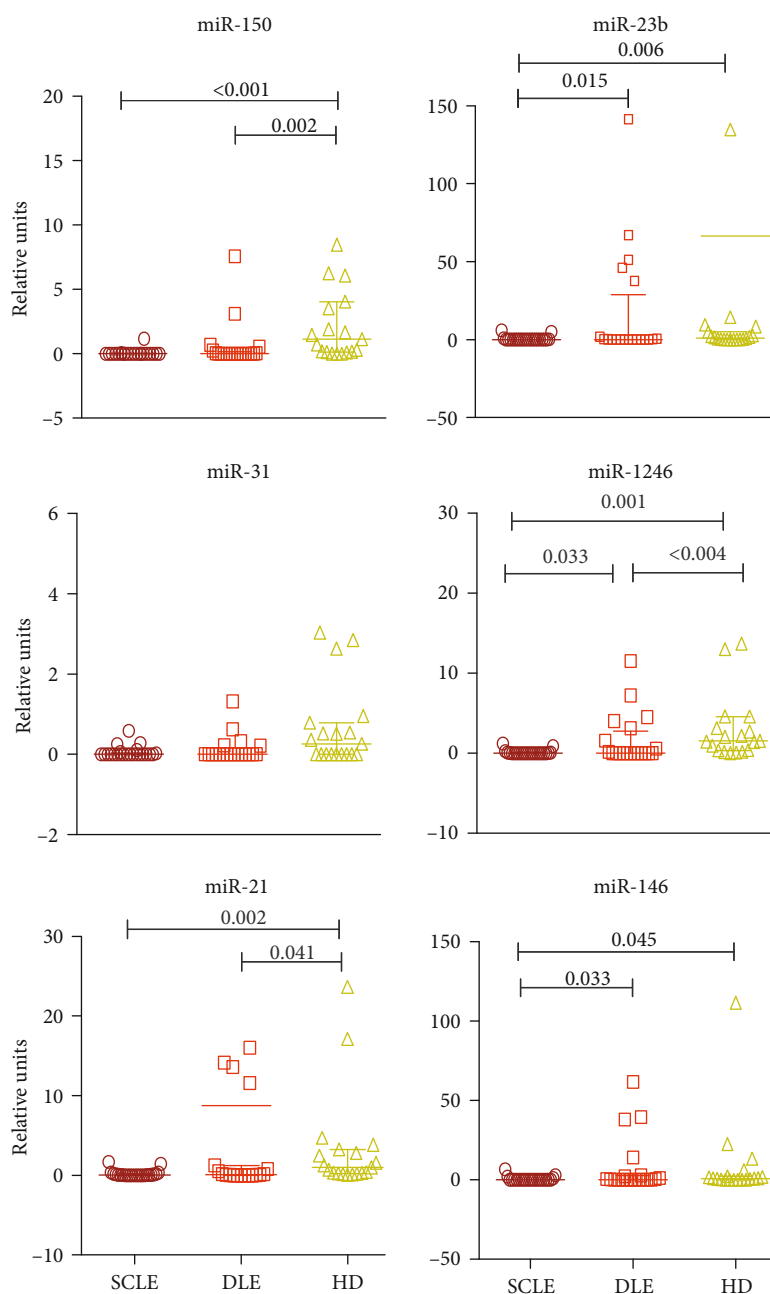


FIGURE 1: Expression of differentially expressed miRNAs in cutaneous lupus. *The results are expressed as the median and range (5th/95th percentiles). Kruskal-Wallis test and post hoc analysis (Dunn's test). SCLE: subacute cutaneous lupus erythematosus; DLE: discoid lupus erythematosus; HD: healthy donors.

associated positively with miR-150 (Figure 3(c), Table 3), and CD20⁺/IL-10⁺ cells with miR-1246 and miR-146a (Figure 3(f), Table 3).

3.5. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway Enrichment Analysis of miRNAs Differentially Expressed in Patients with SCLE and DLE. The predicted targets and pathways of the differentially expressed miRNAs and their correlation with specific circulating and skin T cell subpopulations in both clinical conditions (SCLE: miR-21, miR-31, and miR-23b and DLE: miR-150, miR-1246, and miR-146a) were analyzed by using the KEGG pathway

enrichment strategy. The analysis of the predicted targets and pathways revealed that in SCLE, miR-21 was linked with Hippo signaling, bacterial invasion of epithelial cells, transcriptional regulation of cancer, prolactin signaling, FoxO signaling, and biosynthesis and degradation of fatty acids. Interestingly, miR-31 also was connected with cancer pathways associated with miR-21 and miR-23b. In addition, we found that miR-31 was significantly associated with TNF signaling.

Regarding DLE, miR-146a expression was significantly linked to immune relevant pathways including NF-kappa B signaling, Toll-like receptor signaling. miR-1246 was

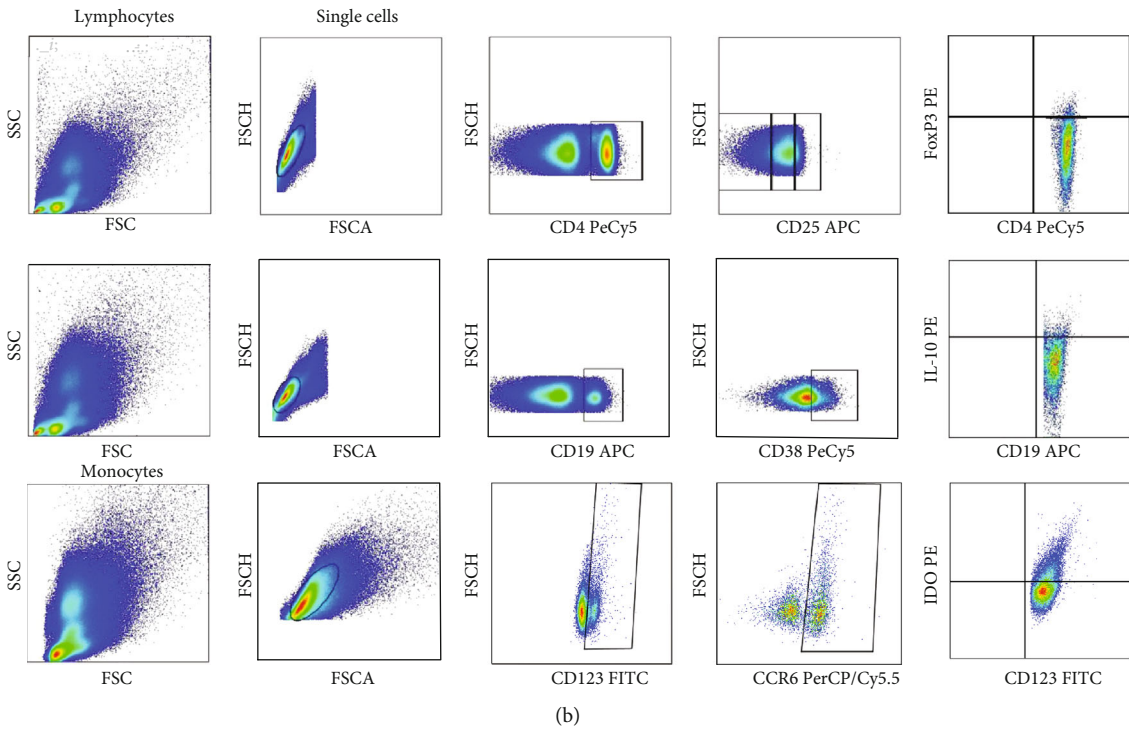
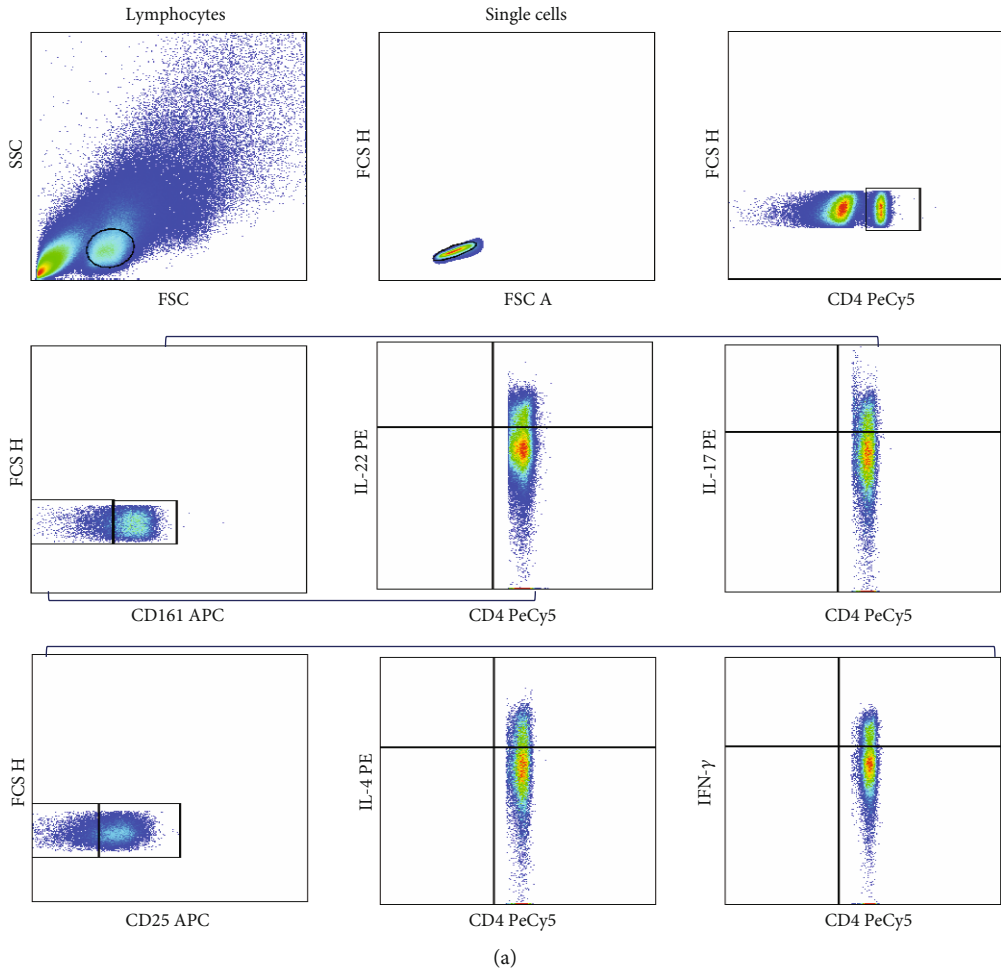


FIGURE 2: Continued.

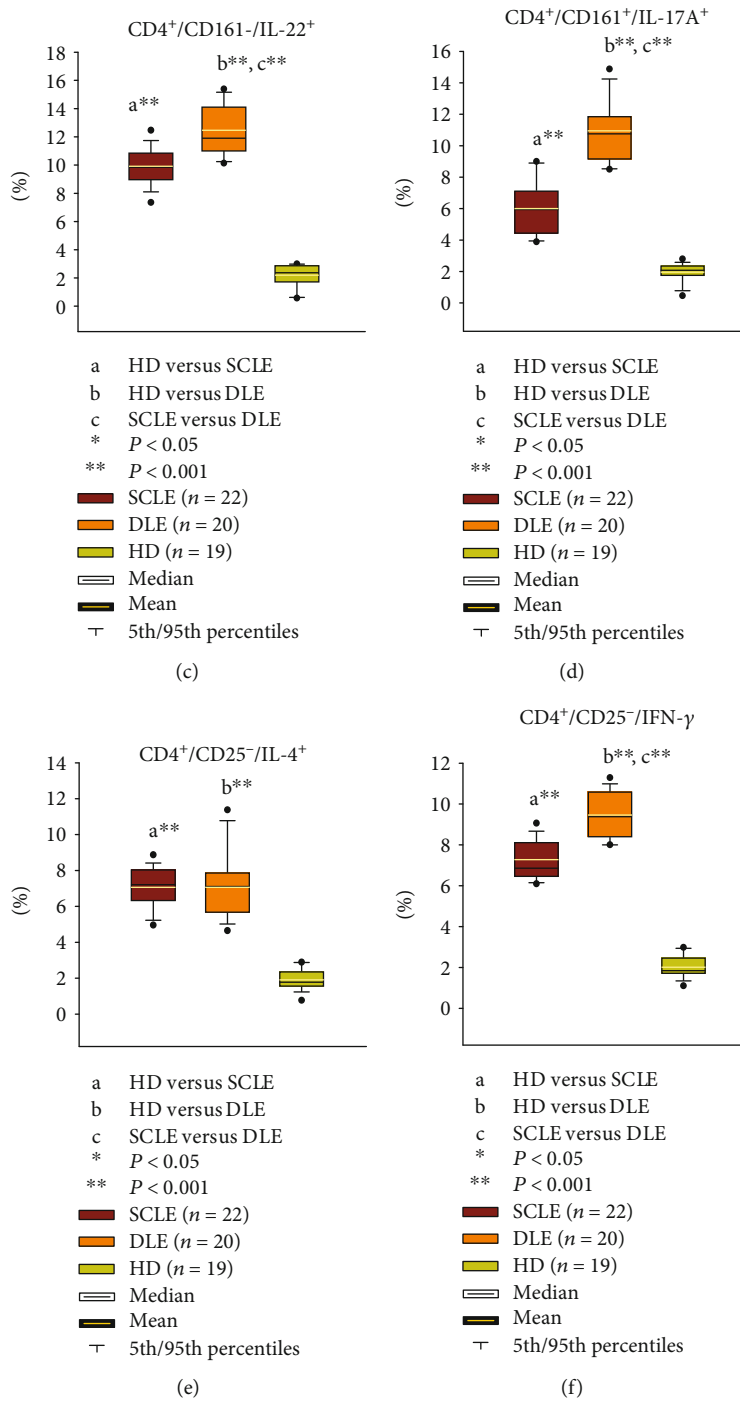


FIGURE 2: Continued.

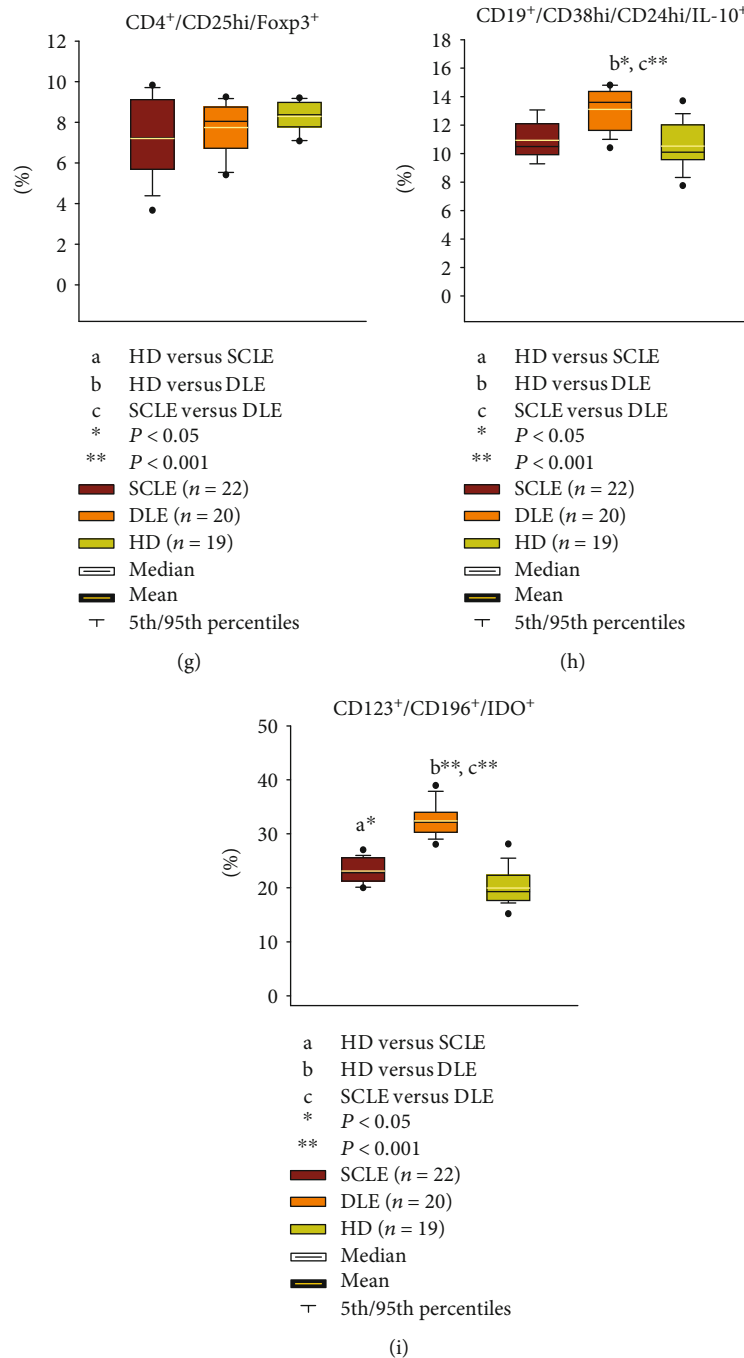


FIGURE 2: (a) Representative gating strategy of each cell population of CD4 effector T cells. (b) Representative gating strategy of each cell population of regulatory cells of a DLE patient. Percentages of circulating (c) CD4⁺/CD161⁻/IL-22⁺ cells, (d) CD4⁺/CD161⁺/IL-17A⁺ cells, (e) CD4⁺/CD25⁻/IL-4⁺ cells, (f) CD4⁺/CD25⁺/IFN- γ ⁺ cells, (g) CD4⁺/CD25^{hi}/Foxp3⁺ cells, (h) CD19⁺/CD38^{hi}/IL-10⁺ cells, and (i) CD123⁺/CD196⁺/IDO⁺ cells. The results are expressed as the mean (horizontal yellow line), median (horizontal black line), and 5th/95th percentiles * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$. SCL: subacute cutaneous lupus erythematosus; DLE: discoid lupus erythematosus; HD: healthy donors.

associated with apoptosis and viral carcinogenesis. Finally, miR-150 in CLE was closely related to HIF-1 signaling and cancer pathways.

Interestingly, the interactome analysis showed a group of pathways that were linked with specific miRNAs expressed in

SCL and DLE patients. In this context, cell cycle regulation, p53 signaling, TGF- β signaling, thyroid hormone signaling, and cancer pathways were shared between miR-21, miR-31, and miR-23b (expressed in SCL) and miR-146a, miR-1246, and miR-150 expressed in DLE patients (Figure 4).

TABLE 2: Multiple linear regression models for patients with SCLE.

	Model	miRNAs	R	R square	β	t	Sig. (P)	95% IC for β		
								Lower	Up	
Peripheral cells										
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ⁻ /IL-4 ⁺	1	miR-23b	0.493	0.244	-0.493	-2.407	0.027	-0.901	-0.061	
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ⁺ /IFN- γ ⁺	1	miR-1246	0.431	0.186	-0.431	-2.908	0.006	-0.399	-0.071	
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25hi/Foxp3 ⁺	1	miR-23b	0.449	0.201	-0.449	-2.13	0.047	-1.47	-0.01	
Tissue cells										
IL-4-expressing CD4 ⁺ cells (epidermis)	1	miR-21	0.487	0.237	0.487	2.365	0.029	0.425	7.171	
IFN- γ -expressing CD4 ⁺ cells (dermis)	1	miR-31	0.467	0.218	0.467	2.238	0.038	0.717	22.62	
IL-10-expressing CD20 ⁺ cells (epidermis)	1	miR-21	0.492	0.242	0.492	2.396	0.028	0.61	9.298	

SCLE: subacute cutaneous lupus erythematosus; DLE: discoid lupus erythematosus; HD: healthy donors.

TABLE 3: Multiple linear regression models for patients with DLE.

	Model	miRNAs	R	R square	β	t	Sig. (P)	95% IC for β		
								Lower	Up	
Peripheral cells										
CD123hi/CD196 ⁺ /IDO ⁺	1	miR-150	0.448	0.201	0.448	2.125	0.048	0.009	1.54	
Tissue cells										
IL-4-expressing CD4 ⁺ cells (dermis)	1	miR-150	0.517	0.267	0.517	2.562	0.020	0.27	2.728	
	1	miR-1246	0.75	0.563	0.75	4.811	<0.001	0.613	1.563	
IL-10-expressing CD20 ⁺ cells (epidermis)	2	miR-1246	0.809	0.655	0.859	5.672	<0.001	0.782	1.709	
		miR-146a			-0.322	-2.13	0.048	-0.165	-0.001	
IL-10-expressing CD20 ⁺ cells (epidermis)	1	miR-1246	0.736	0.542	0.736	4.611	<0.001	0.83	2.22	
	2	miR-1246			0.866	5.874	<0.001	1.15	2.439	
		miR-146a	0.673	0.634	-0.385	-2.612	0.018	-0.256	-0.027	

SCLE: subacute cutaneous lupus erythematosus; DLE: discoid lupus erythematosus; HD: healthy donors.

Importantly, the degree of association between the differentially expressed miRNA signatures and specific T cell subpopulations observed in SCLE and DLE patients and their enrichment with the aforementioned pathways are shown in Figure 5. Detailed *P* values and the degree of association of specific miRNAs and functional pathways are enlisted in Figures S2 and S3.

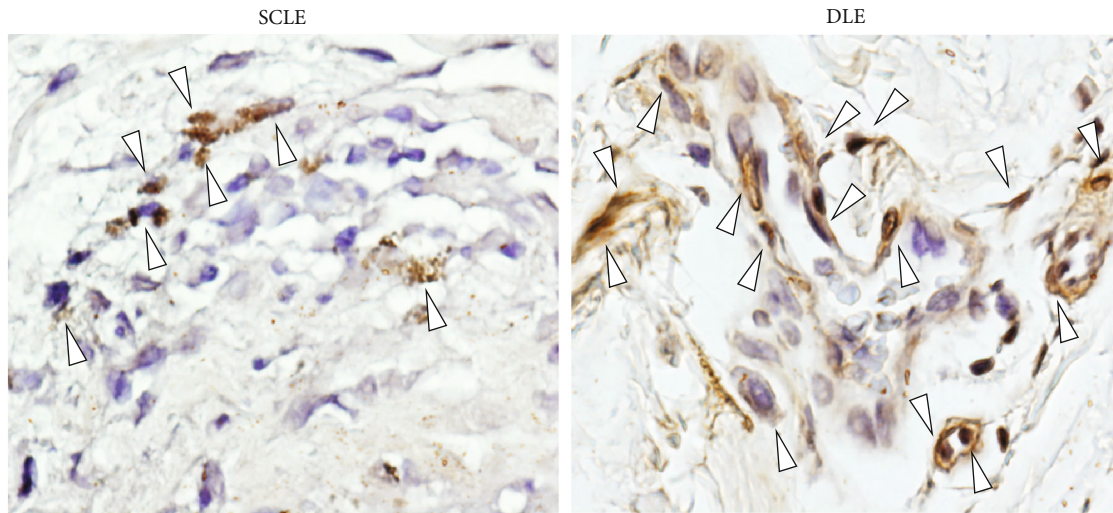
4. Discussion

miRNAs are key determinants in the posttranscriptional regulation of genome [27, 28] and are involved in the control of many biological processes including inflammation [29]. It is well known that an uncontrolled immune inflammatory response might contribute to the pathogenesis of autoimmunity.

In the present work, we explored if the expression of circulating miRNA signature might identify patients with CLE and their varieties, as was described by Solé et al. for miR-31 and miR-485-3p overexpression in DLE compared to SCLE [12]. Our most relevant findings were that miR-150, miR-1246, miR-21, miR-23b, and miR-146 were downregulated in SCLE than in healthy controls. Furthermore, miR-1246, miR-23b, and miR-146 expression was lower in SCLE than in DLE. We observed some differences regarding the association of peripheral and tissue subpop-

ulation expression and the miRNAs according to CLE varieties. Notwithstanding in the SCLE group, miR-23b and miR1246 drove a Th2 and Th1 peripheral response; whereas in the DLE group, miR-1246 was associated with infiltrates of IL-10-producing B cells.

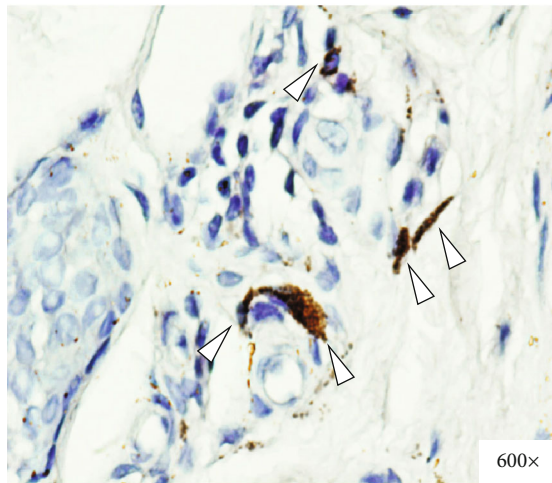
miR-150 is expressed in different lineages of immune cells and is involved in cellular maturation from pro-B to pre-B lymphocytes, as well as in the development and functional activity of NK and iNKT cell lineages [30, 31]. Regarding the participation of miR-150 at the skin biology, it has been demonstrated that its downregulation promotes keratinocyte proliferation in hypoxic conditions through targeting HIF-1 α and VEGF-A [32]. Besides, miR-150 downregulation is associated with the constitutive type I collagen overexpression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin β_3 [33]. miR-150 seems to play an important role in the induction of myofibroblast proliferation and its resistance to apoptosis [34]. Moreover, miR-150 is also downregulated in other autoimmune diseases with skin involvement, including psoriasis and diffuse cutaneous systemic sclerosis (SSc) skin lesions [32]. Specifically, in SSc, downregulation promotes TGF- β signaling and Smad3 phosphorylation, resulting in the transcriptional activation of type I collagen gene and tissue fibrosis [32]. In this vein, a study described that patients with DLE exhibited a distinctive overexpression signature of profibrotic markers including TGF- β and



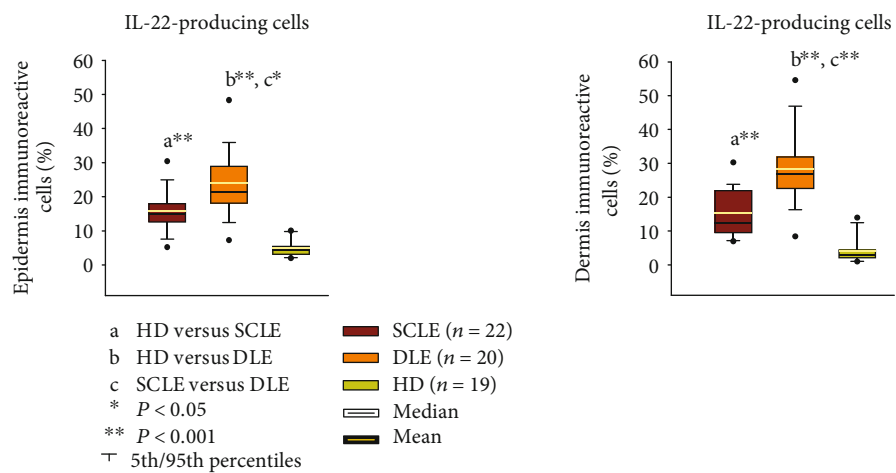
(A)

(B)

HD

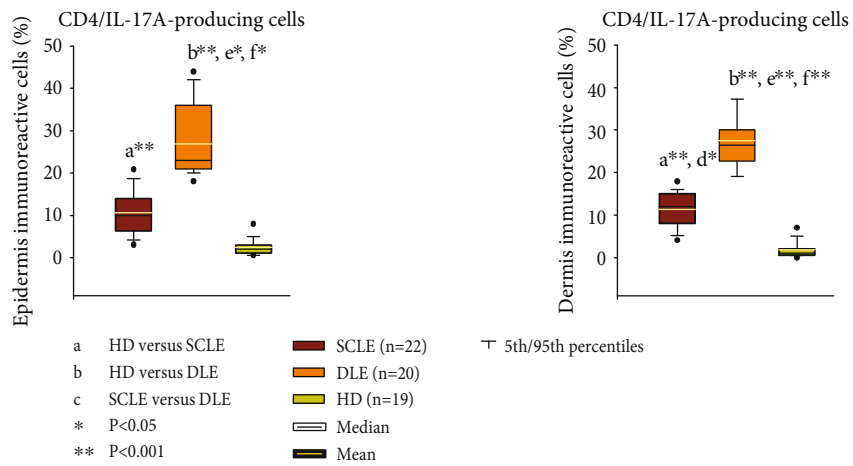
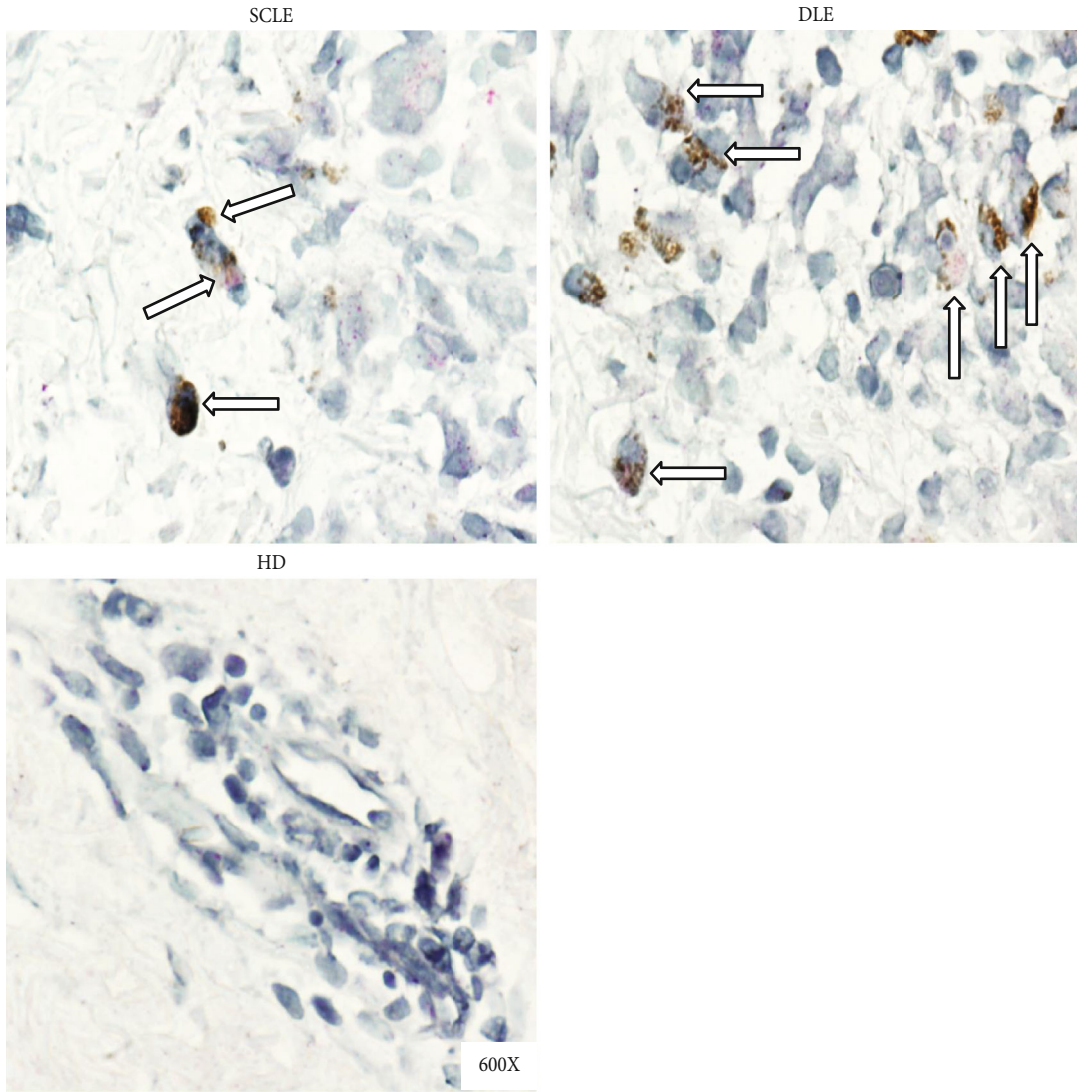


(C)



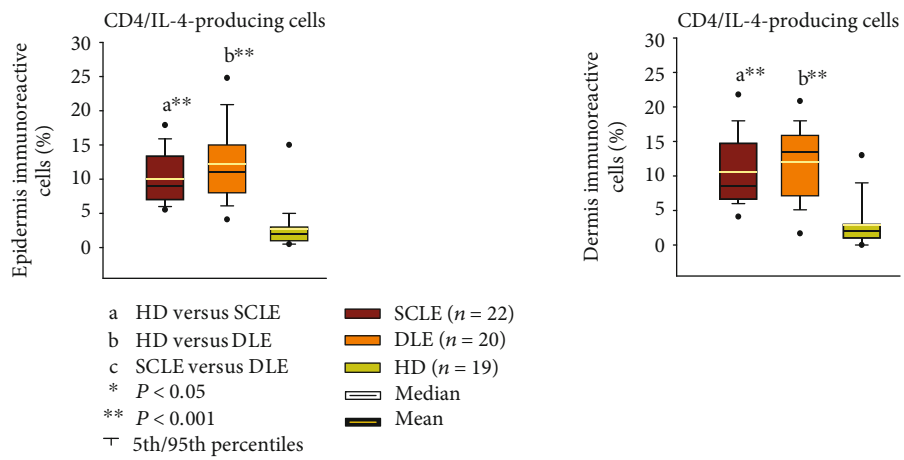
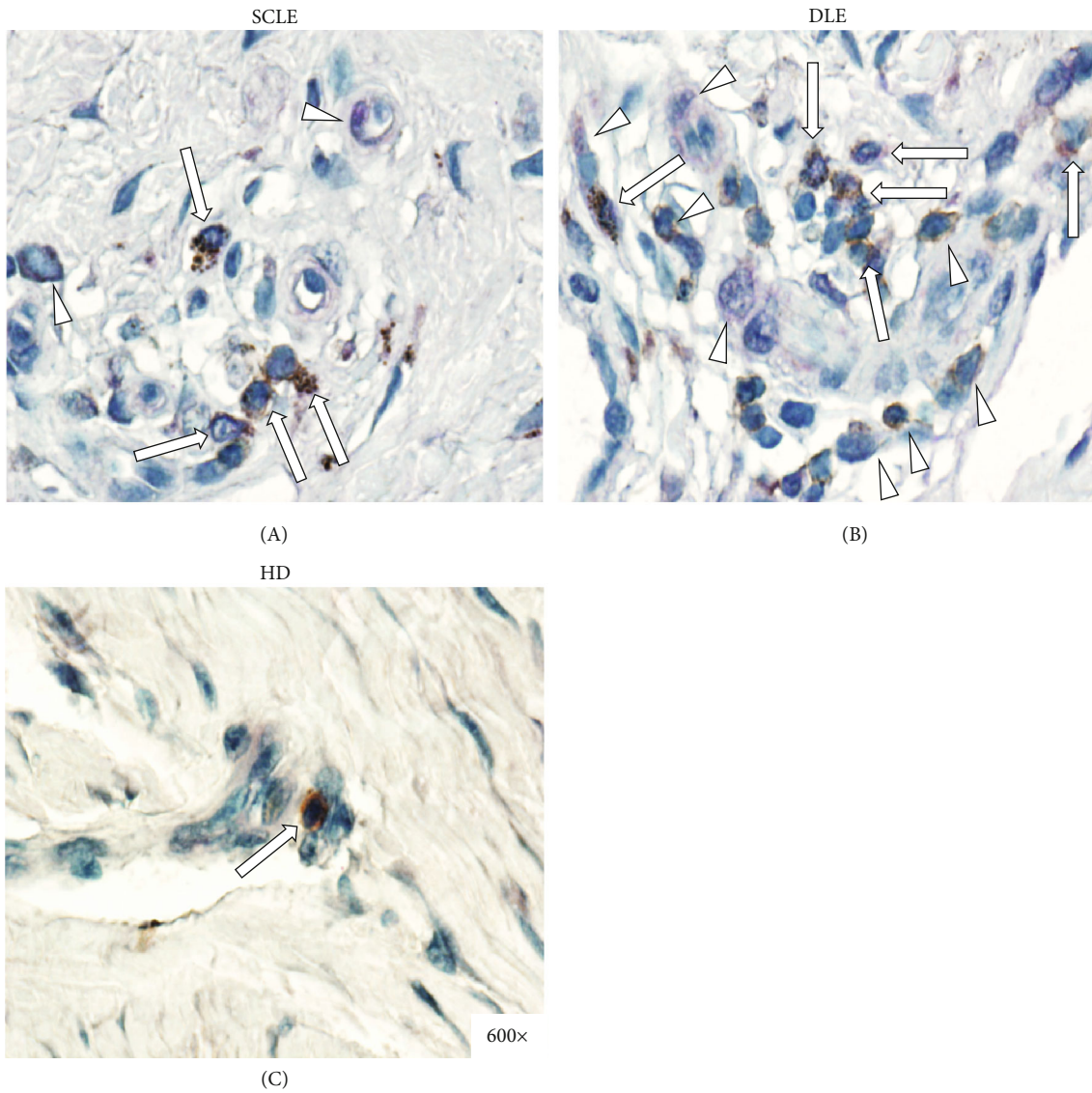
(a)

FIGURE 3: Continued.



(b)

FIGURE 3: Continued.



(c)

FIGURE 3: Continued.

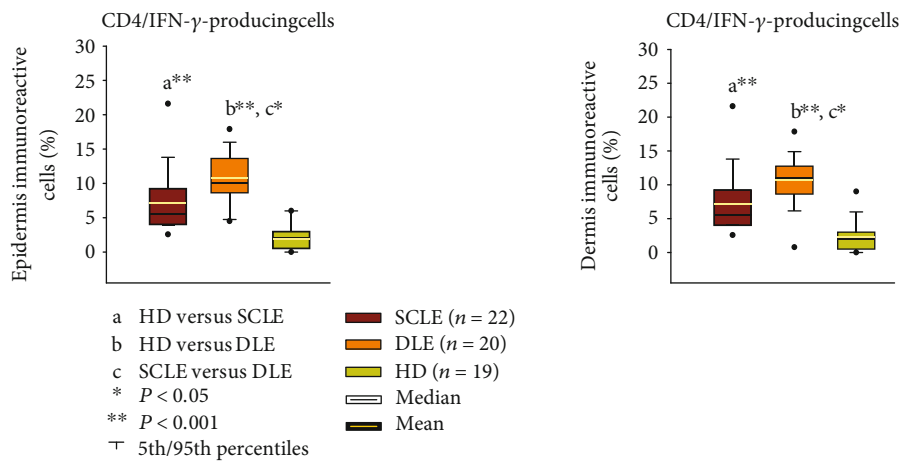
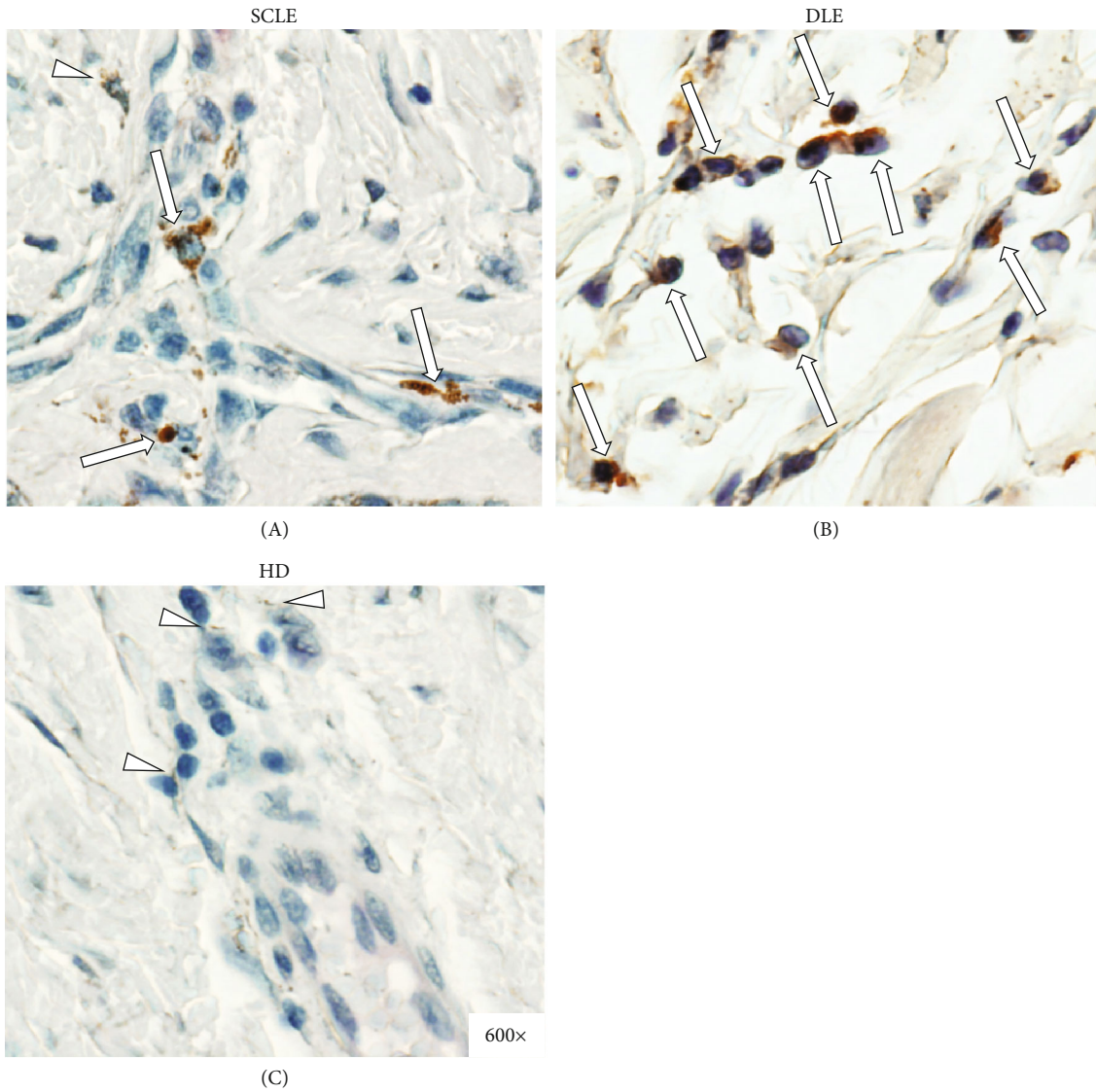
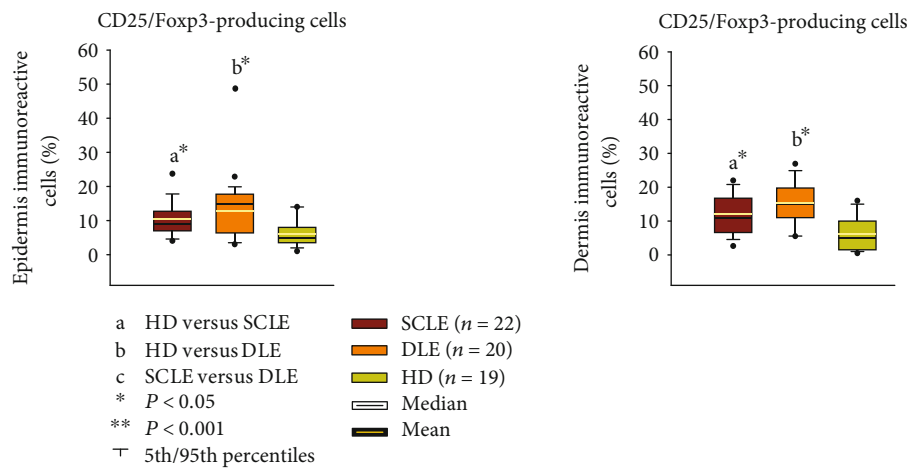
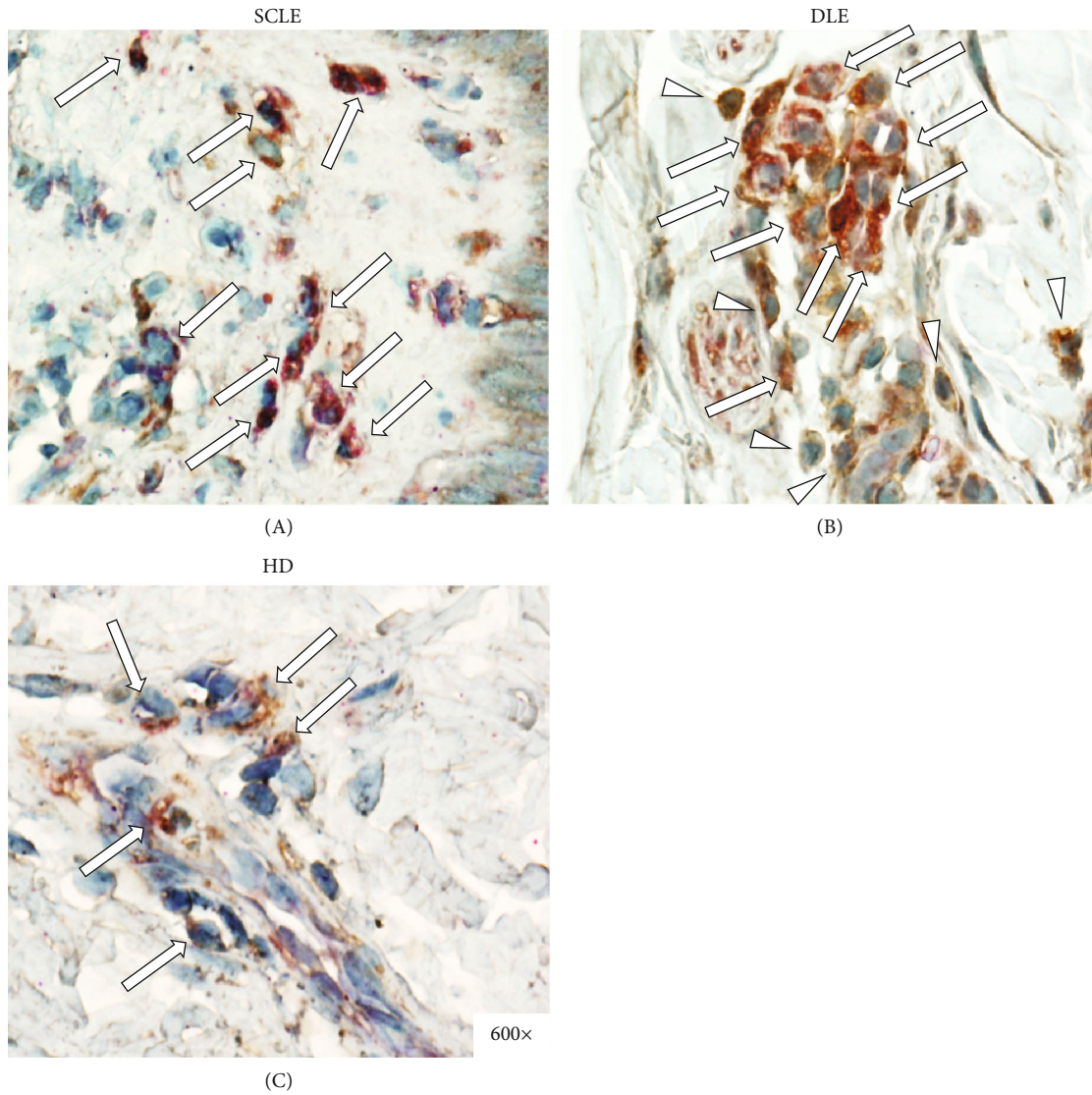
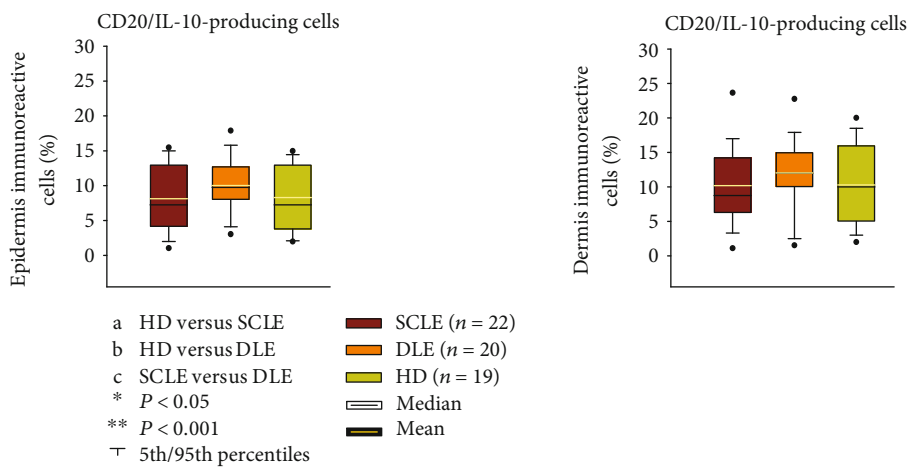
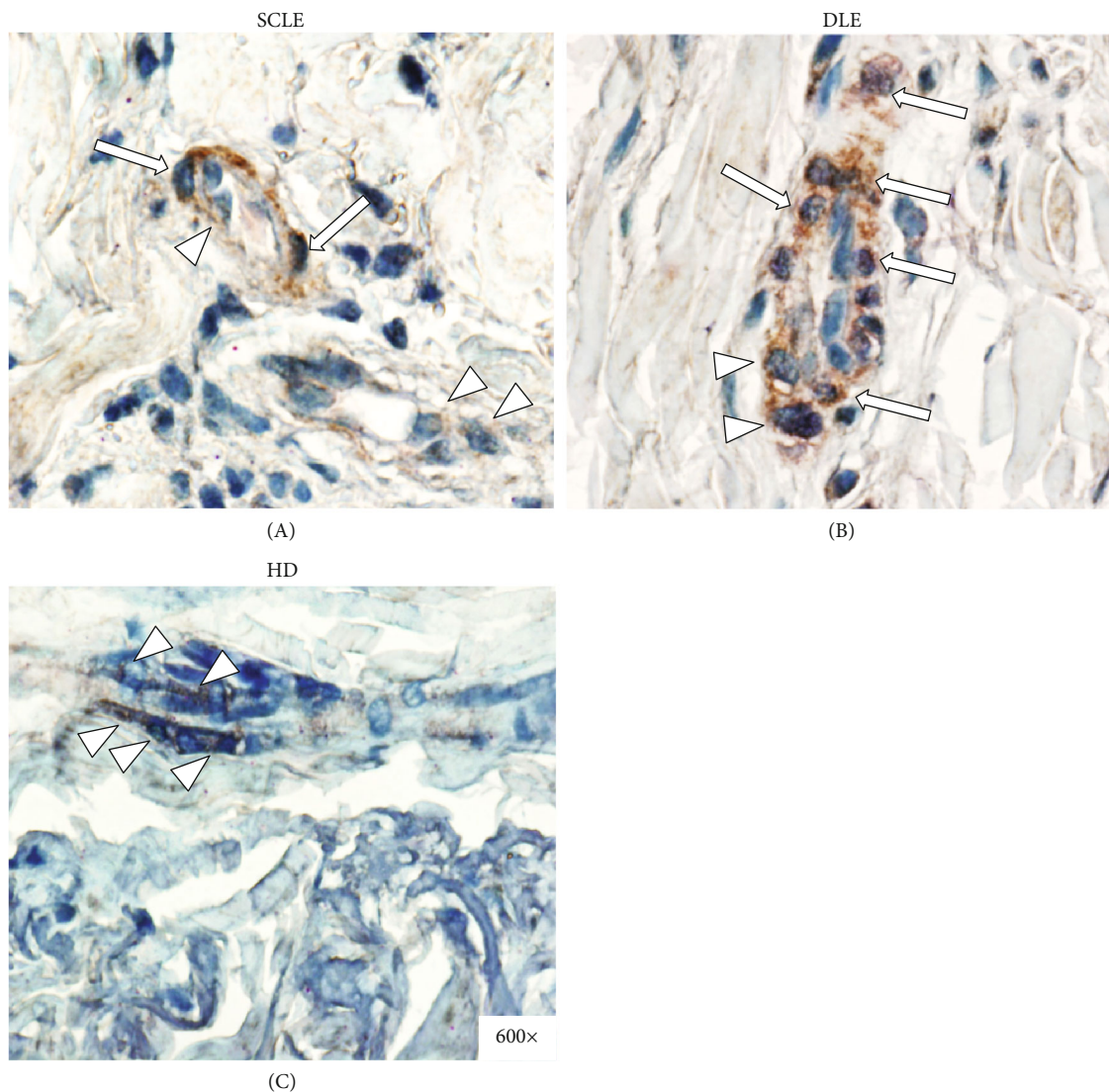


FIGURE 3: Continued.



(e)

FIGURE 3: Continued.



(f)

FIGURE 3: Continued.

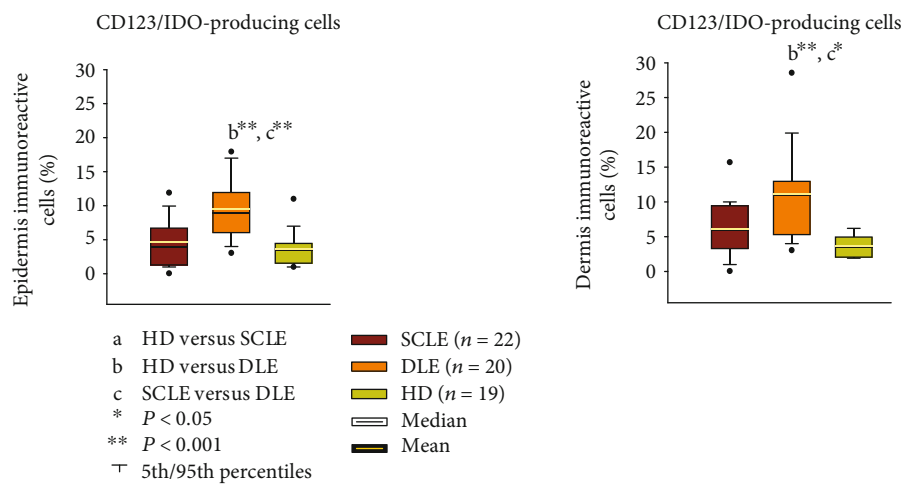
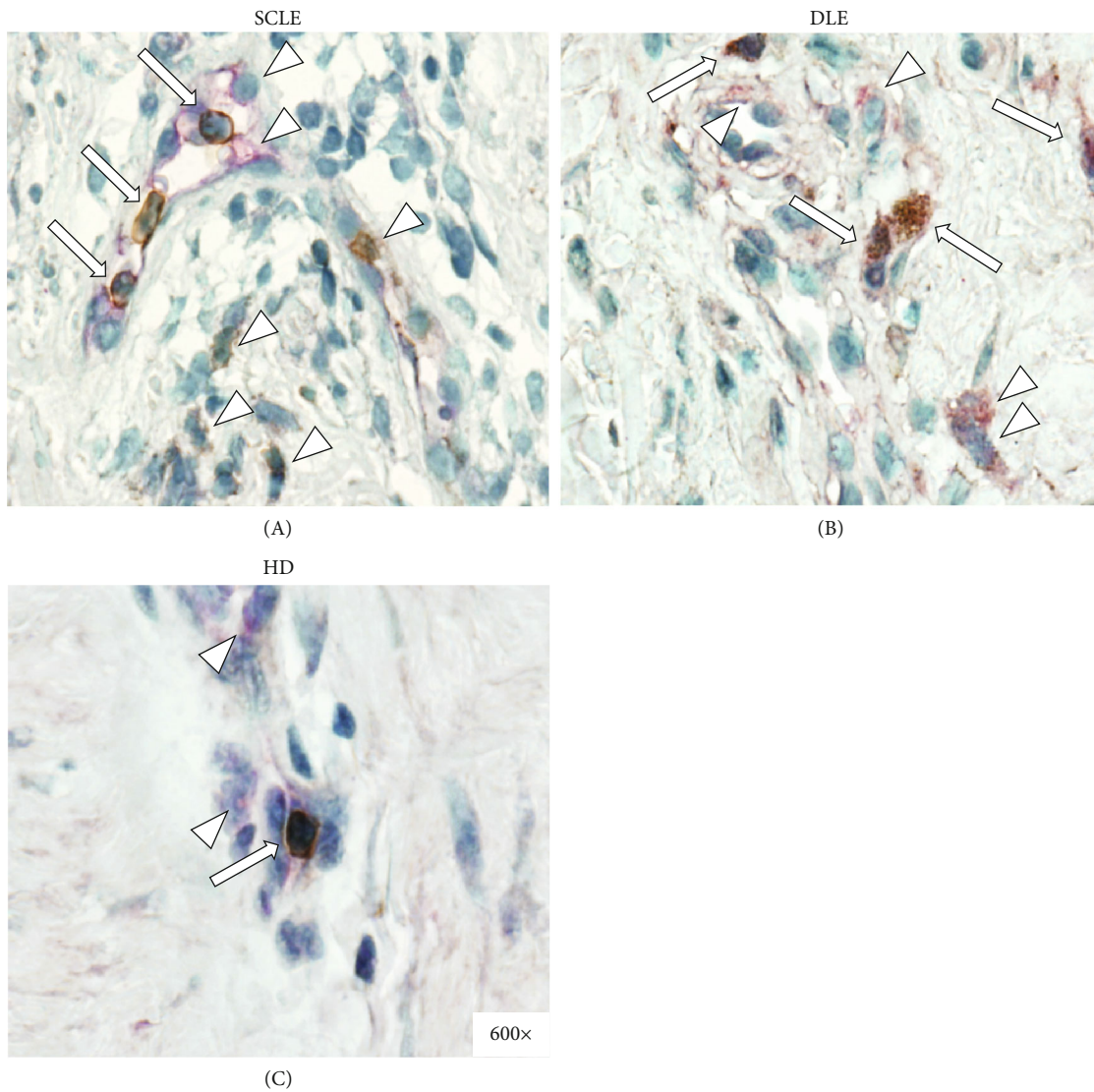
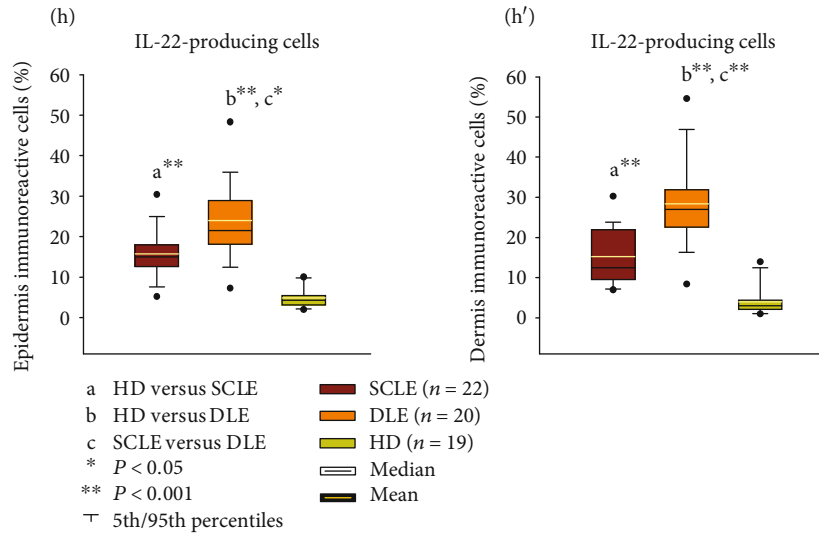
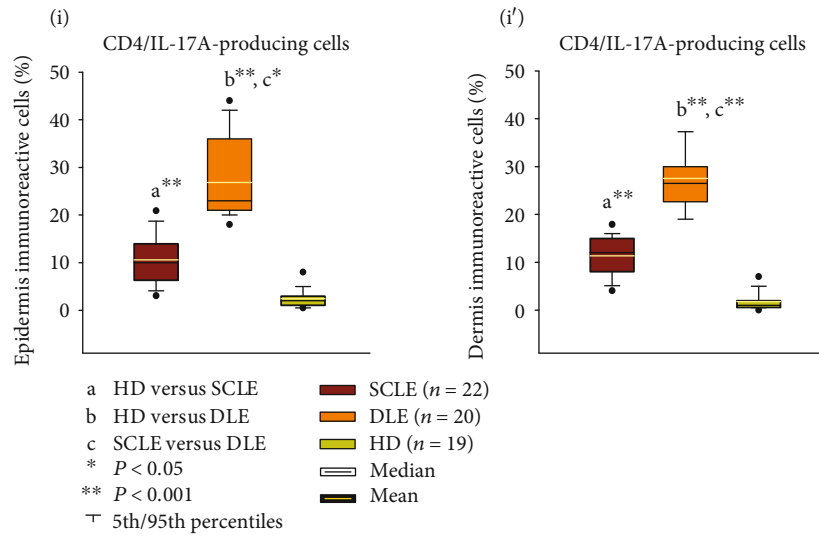


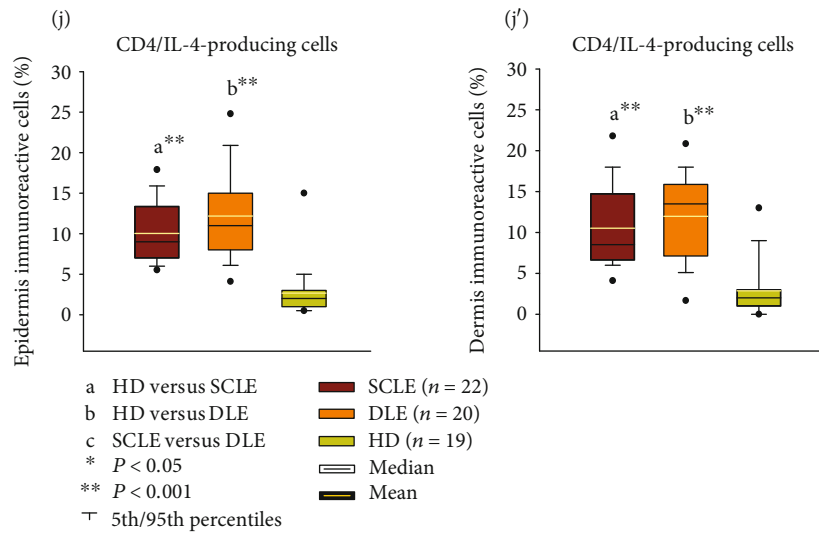
FIGURE 3: Continued.



(h)



(i)



(j)

FIGURE 3: Continued.

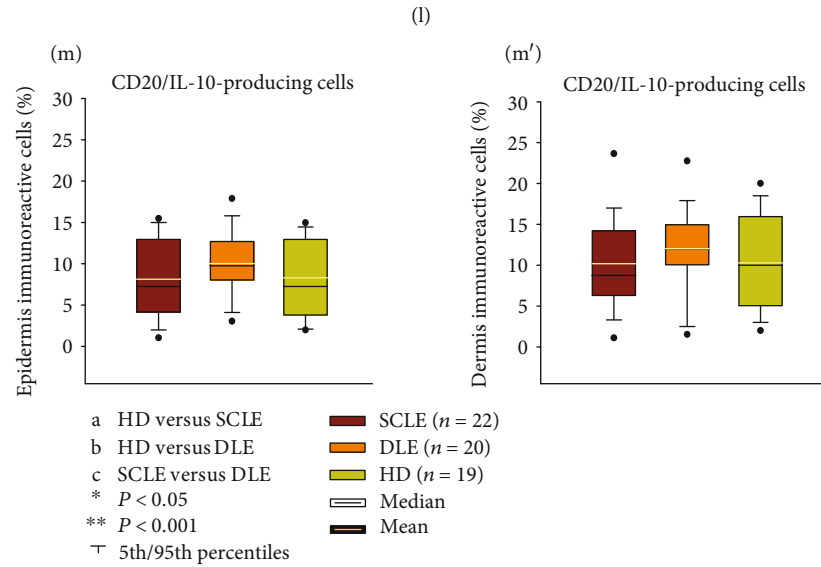
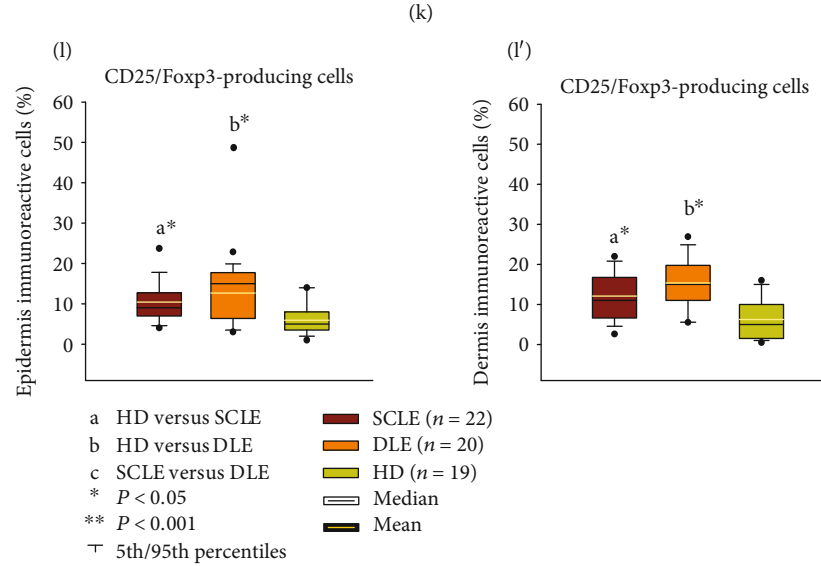
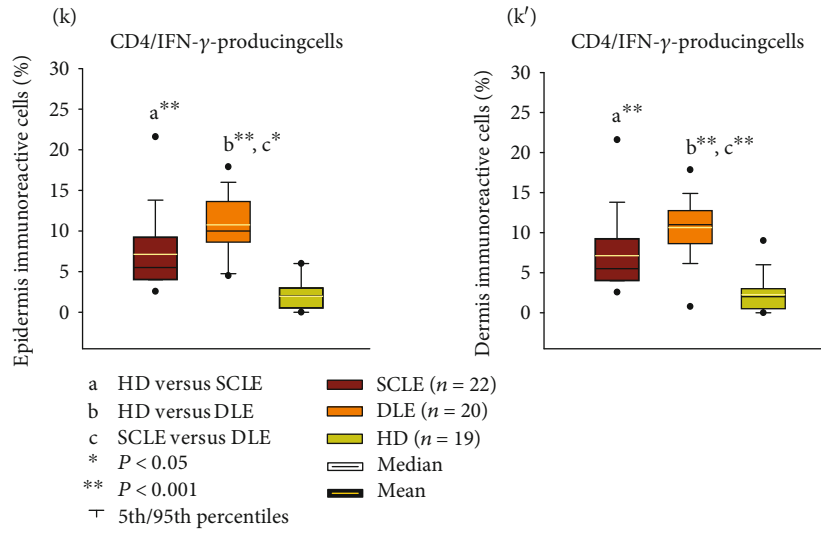


FIGURE 3: Continued.

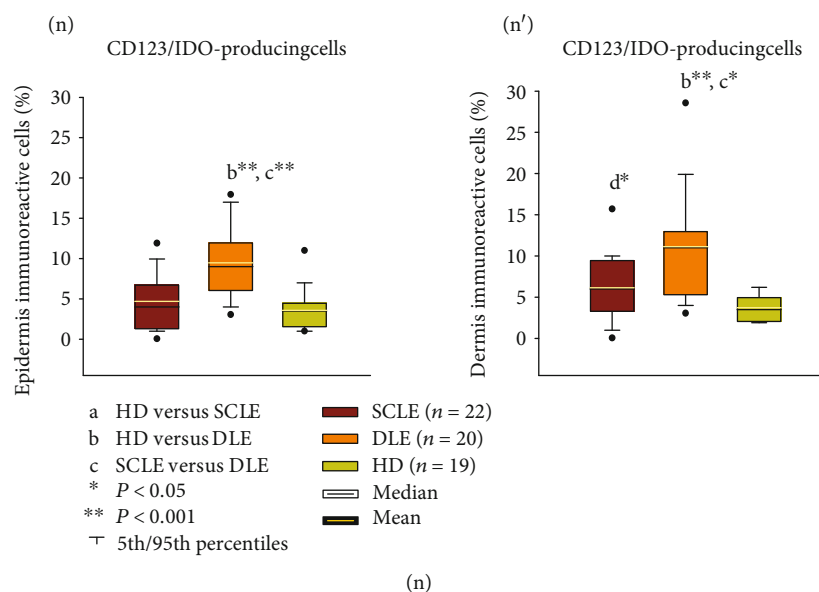


FIGURE 3: Representative immunostaining of (a) IL-22-expressing cells, (b) IL-17A-expressing CD4 T cells, (c) IL-4-expressing CD4 T cells, (d) IFN- γ -expressing CD4 T cells, (e) Foxp3-expressing CD25 T cells, (f) IL-10-expressing CD20 B cells, and (g) IDO-expressing CD123 plasmacytoid dendritic cells in tissue biopsies from subacute cutaneous lupus erythematosus ((A) SCLE), discoid lupus erythematosus ((B) DLE), healthy donors ((C) HD). Arrowheads show single staining (in brown or red), and arrows depict double staining (in burgundy). Original magnification was $\times 600$. (h–n) Percentage of immunoreactive cells per microscopic field. The results are expressed as the mean (horizontal yellow line), median (horizontal black line), and 5th/95th percentiles. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$. SCLE: subacute cutaneous lupus erythematosus; DLE: discoid lupus erythematosus; HD: healthy donors.

SMAD3 [12]. Also, in line with these studies, our findings suggest that the downregulation of miR-150 in CLE might influence the activation of chronic inflammatory and profibrotic pathways.

On the other hand, the role of miR-1246 in normal skin and autoimmune disorders is still poorly characterized. In patients with SLE, it was found downregulated. This low expression might be related to commitment hyperactivation of B cells. Interestingly, B cells from non-active SLE patients have similar expression levels of miR-1246 when compared with healthy volunteers [17]. Moreover, it has been demonstrated that miR-1246 promotes UVB-induced apoptosis by downregulating RTKN2 expression in keratinocytes [35]. Herein, we observed that this miRNA was also downregulated in patients with SCLE and DLE.

Concerning miR-146, it has been observed that melanoma lesions overexpress it [36]. In patients with psoriasis, miR-146a is positively correlated with IL-17 expression in skin lesions and PBMCs [37]. Furthermore, miR-146a regulates the proinflammatory TLR/MyD88 pathway by targeting IRAK1 and TRAF6 [38]. miR-146a also contributes to the development of SLE, due to the reason that it is a negative regulator of type I IFN pathway by targeting IRF5, STAT1, IRAK1, and TRAF6 [34]. As in patients with SLE, herein, we observed a downexpression in CLE. Thus, the decreased expression of miR-146a in PBMCs might contribute to the enhanced production of type I IFN (IFN- α/β) in human lupus.

miR-23b, which is a differentiation marker of human keratinocytes (through repression of TGIF1 and activation

of the TGF- β -SMAD2 signaling pathway), is remarkably upregulated after UVA irradiation of human primary keratinocytes and acts through targeting-related RAS viral oncogene homolog 2 (RRAS2), which is strongly expressed in highly aggressive malignant skin cancer [39, 40]. Moreover, miR-23b promotes cutaneous wound healing through inhibition of the inflammatory responses by targeting ASK1 [41].

Furthermore, we reported a downexpression of miR-21 among CLE patients but not of miR-31. miR-21, as well as miR-31, are master regulators of T cell activation in SLE [42]. Several studies have demonstrated that aberrant expression of miR-21 is involved in the pathogenesis of SSc and psoriasis. miR-21 regulates genes such as SMAD3, SMAD7, and type I collagen, all involved in fibrosis [34]. Moreover, it has been demonstrated a reciprocal regulation between thyroid hormone and miR-21 where miR21 downregulates hedgehog pathway-driven skin tumorigenesis (basal cell carcinoma) [43]. Overexpression of miR-21 also inhibits the growth and metastasis of melanoma cells by targeting MKK3 [44].

In SLE patients, miR-31 was downregulated and negatively associated with disease activity and proteinuria, whereas miR-21 high expression correlated with the SLEDAI score and proteinuria. In addition, a reduced expression of miR-31 appears to alter the production of IL-2 by T cells in SLE patients, possibly influencing the expression of nuclear factor of activated T cells (NFAT) [45].

On the other hand, a recent study described a specific miRNA skin signature for DLE that included miR-31 and miR-485-3p. It demonstrated that the overexpression of

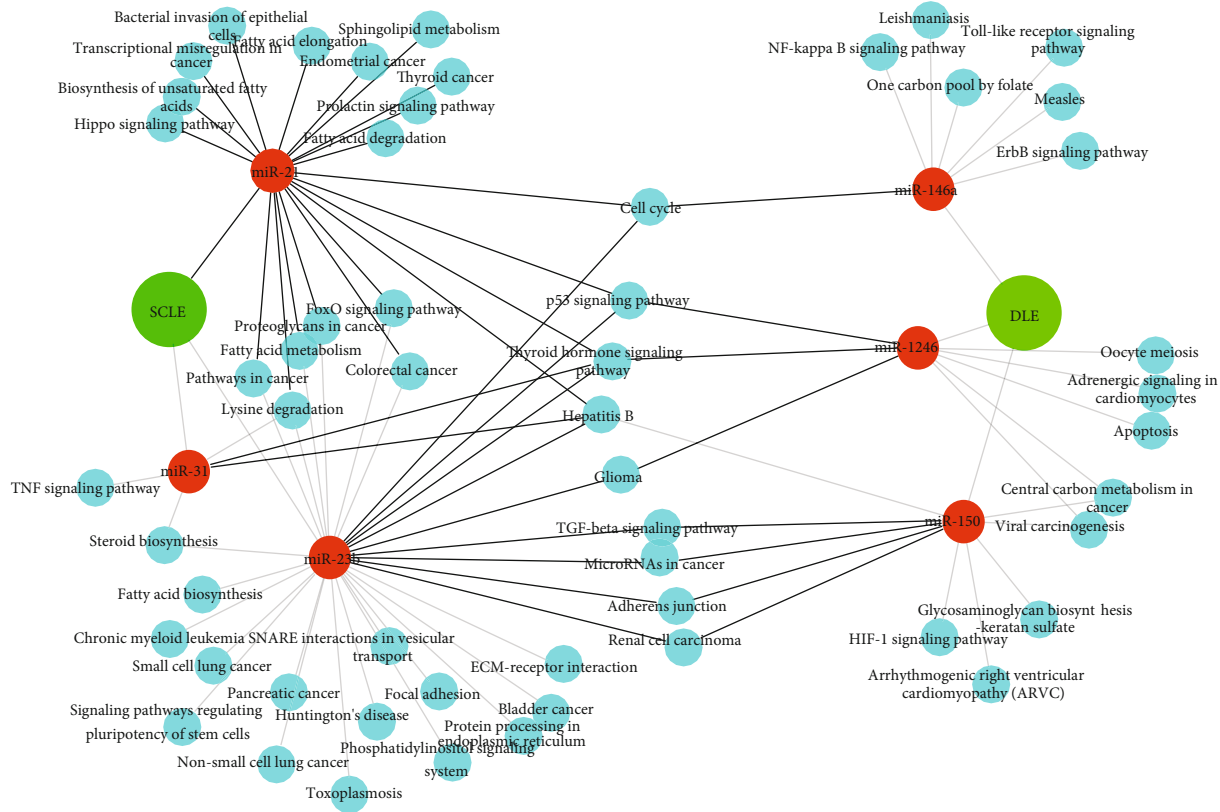


FIGURE 4: Interactome analysis of the most significantly enriched networks of differentially expressed miRNAs in SCLE and DLE patients. miR-21, miR-31, and miR-23b (red circles) are strongly associated with SCLE whereas miR-146a, miR-1246, and miR-150 (red circles) are linked with DLE. Significantly associated pathways enriched in KEGG analysis of these miRNA signatures are also shown in dark green circles.

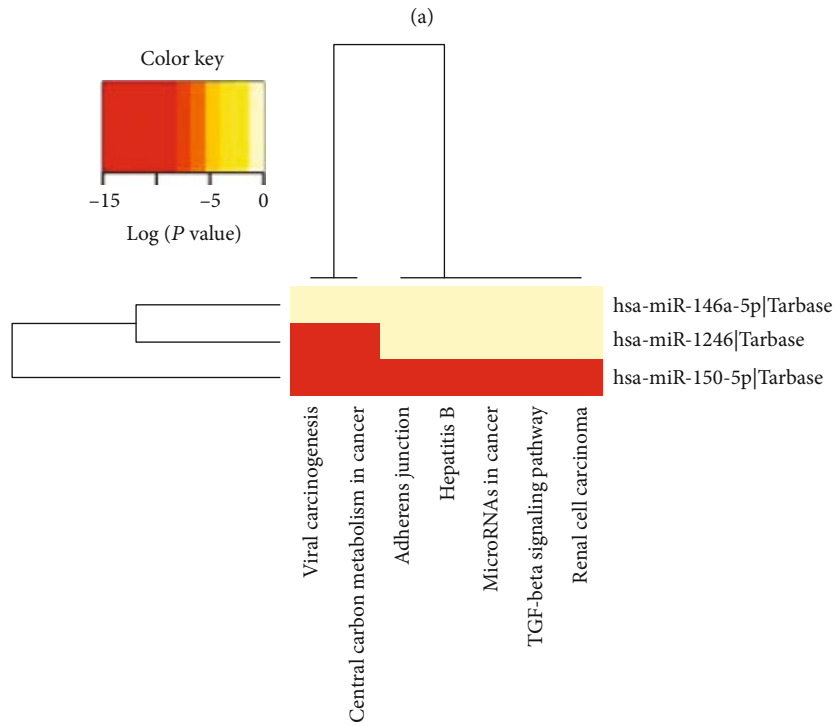
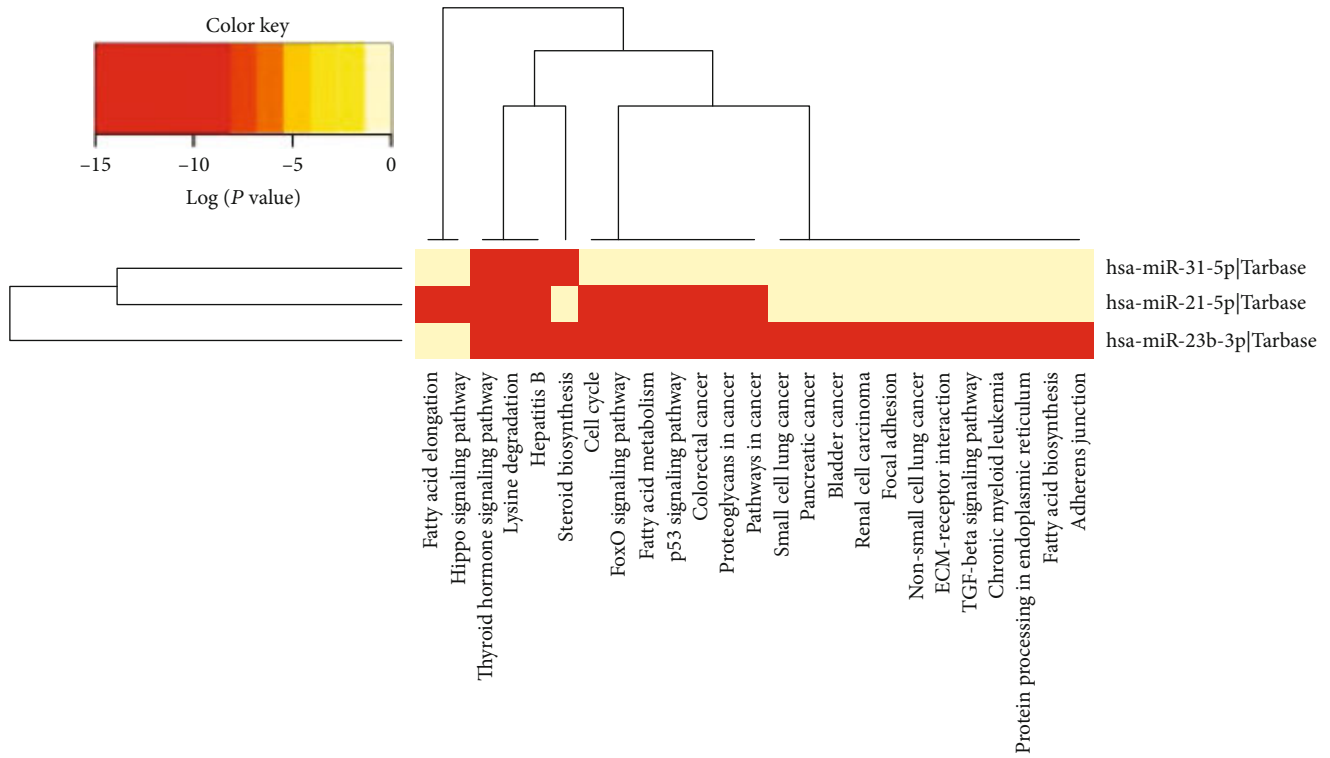
miR-31 was stimulated by UV and TGF- β and this miRNA activated NF- κ B signaling stimulating proinflammatory responses resulting in neutrophil and macrophage infiltrates in skin [2]. miR-31 is a key regulator for promoting keratinocyte proliferation and migration during wound healing [46], and it is overexpressed in SSc, a systemic disease characterized by extensive fibrosis [47, 48].

Finally, the participation of some immune response pathways including PRR signaling, JAK-signal transducer, STAT signaling, NF- κ B signaling, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascade has been described in CLE [5]. Herein, several pathways were linked with the circulating miRNAs differentially expressed in CLE. Interactome network analysis revealed a strong connection between circulating miRNAs in SCLE and DLE groups with a particularly solid network connection such as cell cycle regulation pathways, p53 signaling, TGF- β signaling, NF- κ B signaling, HIF-1 pathway, thyroid hormone signaling, and cancer pathways, among others. Some of them, as previously mentioned, had been described in CLE, but others did not, opening new areas of research. Overall, new insights into the pathogenesis of CLE might allow the development of new target treatments such as the inhibition of these immune pathways.

Certainly, we acknowledge that our study has the following limitations: first, a limited sample size and the lack

of a replication cohort. Notwithstanding, our sample was carefully clinically selected and was able to detect differences in the expression of miRNAs among the different groups of CLE patients. Second, we did not evaluate the presence of miRNAs in skin biopsies. However, we were interested in studying circulating miRNAs with the purpose of further using them as future potential blood-based biomarkers to assess relapses and response to treatment, without the need of a skin biopsy. Finally, at the analysis of peripheral and skin subpopulations, none of the downregulated circulating miRNAs were associated with Th17 and Th22 cells previously recognized as participants in CLE pathogenesis. Thus, it is highly probable that other miRNAs might be also implicated in the regulation of these cell subpopulations. Besides these limitations, we consider that our current manuscript is of relevance particularly for the scant information regarding the pathogenesis of CLE.

Summing up, we determined downregulation of miR-150, miR-1246, and miR-21 in CLE patients. SCLE variety had the lowest levels of miR-1246, miR-146, and miR-23b. Overall, these miRNAs drove the presence of different peripheral and skin subpopulations and participated in diverse pathways. Further research is needed to validate our results in other populations and to evaluate the role of these miRNAs as clinical biomarkers.



(b)

FIGURE 5: (a) Heat map of KEGG pathways enriched with gene regulated by a combination of hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-21-5p, and hsa-miR-31-5p (SCLE); (b) heat map of KEGG pathways enriched with gene regulated by a combination of hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1246, and hsa-miR-146a-5p (DLE).

Data Availability

Data will be provided based on requirement.

Additional Points

What Is Already Known About This Topic. (1) Cutaneous lupus erythematosus (CLE) is an autoimmune condition that comprehends a wide range of dermatological manifestations that can appear independently, or precede, systemic lupus erythematosus. (2) The pathogenesis of CLE is multifactorial and involves genetic predisposition, environmental factors, and abnormalities in the innate and adaptive immune response. (3) Recent studies have revealed the potential contribution of miRNAs in the regulation of signaling pathways. *What Does This Study Add.* (1) Circulating miR-150, miR-1246, and miR-21 were decreased in CLE patients. (2) SCLC variety was associated with lower levels of miR-21, miR-23b, and miR-31. (3) DLE variety was associated with lower levels of miR-146, miR-150, and miR-1246. These miRNAs drove the presence of different peripheral and skin subpopulations and participated in diverse pathways. *What Is the Translational Message.* (1) Circulating miRNAs could be used as future potential blood-based biomarkers to assess relapses and response to treatment, without the need of a skin biopsy. (2) Regulation of circulating miRNAs could be useful in the treatment of CLE.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

SMF obtained patient consent to participate, followed up the patients, gathered clinical information tissue and blood samples, performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. GRM, LJA, ACL, NERZ, and BOQ performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. JZ, GHM, and JFC designed the study, performed experiments, supervised the research, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Acknowledgments

This study was financially supported by INER. Silvia Méndez-Flores is a student of the PhD program: Programa de Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de México.

Supplementary Materials

Supplementary Figure 1: representative immunostaining of (a) IL-22-expressing cells, (b) IL-17A-expressing cells, (c) IL-4-expressing cells, (d) IFN- γ -expressing cells, (e) Foxp3-expressing cells, (f) IL-10-expressing cells, and (g) IDO-expressing cells in tissue biopsies from spleen. Original magnification was $\times 600$. Supplementary Figure 2: heat map of KEGG pathways enriched with gene regulated by a combina-

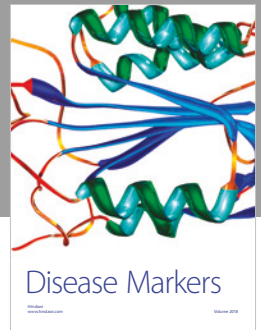
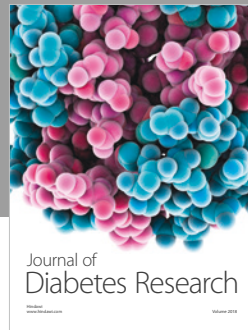
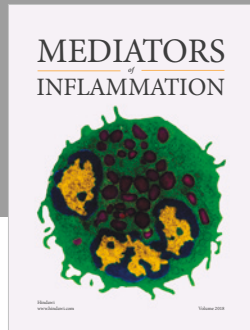
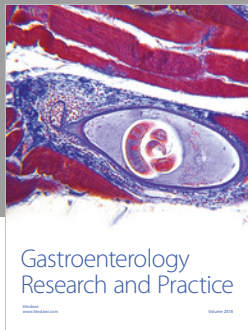
tion of hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1246, and hsa-miR-146a-5p in patients with DLE. Supplementary Figure 3: heat map of KEGG pathways enriched with gene regulated by a combination of hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-21-5p, and hsa-miR-31-5p in patients with SCLC. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] M. G. Kirchhof and J. P. Dutz, "The immunopathology of cutaneous lupus erythematosus," *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, vol. 40, no. 3, pp. 455–474, 2014.
- [2] A. Kuhn, D. Bein, and G. Bonsmann, "The 100th anniversary of lupus erythematosus tumidus," *Autoimmunity Reviews*, vol. 8, no. 6, pp. 441–448, 2009.
- [3] Y. Zhang, J. Wu, Y. F. Han, Z. R. Shi, and L. Wang, "Pathogenesis of cutaneous lupus erythema associated with and without systemic lupus erythema," *Autoimmunity Reviews*, vol. 16, no. 7, pp. 735–742, 2017.
- [4] S. Méndez-Flores, G. Hernández-Molina, A. B. Enríquez et al., "Cytokines and effector/regulatory cells characterization in the physiopathology of cutaneous lupus erythematosus: a cross-sectional study," *Mediators of Inflammation*, vol. 2016, Article ID 7074829, 15 pages, 2016.
- [5] J. Wenzel, "Cutaneous lupus erythematosus: new insights into pathogenesis and therapeutic strategies," *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 15, no. 9, pp. 519–532, 2019.
- [6] R. Dai and S. A. Ahmed, "MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases," *Translational Research*, vol. 157, no. 4, pp. 163–179, 2011.
- [7] D. T. Gracias and P. D. Katsikis, "MicroRNAs: key components of immune regulation," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 780, pp. 15–26, 2011.
- [8] B. Zhang, Q. Wang, and X. Pan, "MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 210, no. 2, pp. 279–289, 2007.
- [9] S. O. Steen, L. V. Iversen, A. L. Carlsen et al., "The circulating cell-free microRNA profile in systemic sclerosis is distinct from both healthy controls and systemic lupus erythematosus," *The Journal of Rheumatology*, vol. 42, no. 2, pp. 214–221, 2015.
- [10] G. Wang, L. S. Tam, E. K. Li et al., "Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus," *Lupus*, vol. 20, no. 5, pp. 493–500, 2011.
- [11] Y. Dai, Y. S. Huang, M. Tang et al., "Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients," *Lupus*, vol. 16, no. 12, pp. 939–946, 2007.
- [12] C. Solé, S. Domingo, B. Ferrer, T. Moliné, J. Ordi-Ros, and J. Cortés-Hernández, "MicroRNA expression profiling identifies miR-31 and miR-485-3p as regulators in the pathogenesis of discoid cutaneous lupus," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 139, no. 1, pp. 51–61, 2019.
- [13] X. Wang, C. Zhang, Z. Wu, Y. Chen, and W. Shi, "CircIBTK inhibits DNA demethylation and activation of AKT signaling pathway via miR-29b in peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 20, no. 1, p. 118, 2018.
- [14] A. Liston, A. S. Papadopoulou, D. Danso-Abeam, and J. Dooley, "MicroRNA-29 in the adaptive immune system:

- setting the threshold," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 69, no. 21, pp. 3533–3541, 2012.
- [15] L. P. Tan, M. Wang, J. L. Robertus et al., "miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes," *Laboratory Investigation*, vol. 89, no. 6, pp. 708–716, 2009.
- [16] S. Zhu, W. Pan, X. Song et al., "The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK- α ," *Nature Medicine*, vol. 18, no. 7, pp. 1077–1086, 2012.
- [17] S. Luo, Y. Liu, G. Liang et al., "The role of microRNA-1246 in the regulation of B cell activation and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus," *Clinical Epigenetics*, vol. 7, p. 24, 2015.
- [18] T. X. Lu, J. Hartner, E. J. Lim et al., "MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity," *Journal of Immunology*, vol. 187, no. 6, pp. 3362–3373, 2011.
- [19] N. A. Stepicheva and J. L. Song, "Function and regulation of microRNA-31 in development and disease," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 83, no. 8, pp. 654–674, 2016.
- [20] M. M. Perry, S. A. Moschos, A. E. Williams, N. J. Shepherd, H. M. Larner-Svensson, and M. A. Lindsay, "Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells," *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 8, pp. 5689–5698, 2008.
- [21] H. X. Fu, X. P. Fan, M. Li, M. J. Liu, and Q. L. Sun, "MiR-146a relieves kidney injury in mice with systemic lupus erythematosus through regulating NF- κ B pathway," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 23, no. 16, pp. 7024–7032, 2019.
- [22] J. Zhang, Y. Cheng, W. Cui, M. Li, B. Li, and L. Guo, "MicroRNA-155 modulates Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 266, no. 1-2, pp. 56–63, 2014.
- [23] G. Lerman, M. Sharon, R. Leibowitz-Amit, Y. Sidi, and D. Avni, "The crosstalk between IL-22 signaling and miR-197 in human keratinocytes," *PLoS One*, vol. 9, no. 9, article e107467, 2014.
- [24] M. C. Hochberg, "Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 40, no. 9, article 1725, 1997.
- [25] J. Albrecht, L. Taylor, J. A. Berlin et al., "The CLASI (Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index): an outcome instrument for cutaneous lupus erythematosus," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 125, no. 5, pp. 889–894, 2005.
- [26] S. Méndez-Flores, G. Hernández-Molina, D. Azamar-Llamas, J. Zúñiga, J. Romero-Díaz, and J. Furuzawa-Carballeda, "Inflammatory chemokine profiles and their correlations with effector CD4 T cell and regulatory cell subpopulations in cutaneous lupus erythematosus," *Cytokine*, vol. 119, pp. 95–112, 2019.
- [27] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*," *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 843–854, 1993.
- [28] B. Wightman, I. Ha, and G. Ruvkun, "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*," *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 855–862, 1993.
- [29] I. Alevizos and G. G. Illei, "MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases," *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 6, no. 7, pp. 391–398, 2010.
- [30] C. Xiao, D. P. Calado, G. Galler et al., "MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb," *Cell*, vol. 131, no. 1, pp. 146–159, 2007.
- [31] N. A. Bezman, T. Chakraborty, T. Bender, and L. L. Lanier, "miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 208, no. 13, pp. 2717–2731, 2011.
- [32] Y. Li, J. Su, F. Li, X. Chen, and G. Zhang, "MiR-150 regulates human keratinocyte proliferation in hypoxic conditions through targeting HIF-1 α and VEGFA: implications for psoriasis treatment," *PLoS One*, vol. 12, no. 4, article e0175459, 2017.
- [33] N. Honda, M. Jinnin, T. Kira-Etoh et al., "miR-150 down-regulation contributes to the constitutive type I collagen over-expression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin β 3," *The American Journal of Pathology*, vol. 182, no. 1, pp. 206–216, 2013.
- [34] J. Q. Chen, G. Papp, P. Szodoray, and M. Zehner, "The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases," *Autoimmunity Reviews*, vol. 15, no. 12, pp. 1171–1180, 2016.
- [35] W. Li, Y. F. Wu, R. H. Xu, H. Lu, C. Hu, and H. Qian, "miR-1246 releases RTKN2-dependent resistance to UVB-induced apoptosis in HaCaT cells," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 394, no. 1-2, pp. 299–306, 2014.
- [36] M. Aksenenko, N. Palkina, A. Komina, L. Tashireva, and T. Ruksha, "Differences in microRNA expression between melanoma and healthy adjacent skin," *BMC Dermatology*, vol. 19, no. 1, p. 1, 2019.
- [37] P. Xia, X. Fang, Z. H. Zhang et al., "Dysregulation of miRNA146a versus IRAK1 induces IL-17 persistence in the psoriatic skin lesions," *Immunology Letters*, vol. 148, no. 2, pp. 151–162, 2012.
- [38] K. D. Taganov, M. P. Boldin, K. J. Chang, and D. Baltimore, "NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 33, pp. 12481–12486, 2006.
- [39] L. Barbolat-Boutrand, N. Joly-Tonetti, M. Dos Santos et al., "MicroRNA-23b-3p regulates human keratinocyte differentiation through repression of TGIF1 and activation of the TGF- β -SMAD2 signalling pathway," *Experimental Dermatology*, vol. 26, no. 1, pp. 51–57, 2017.
- [40] A. Kraemer, I.-P. Chen, S. Henning et al., "UVA and UVB irradiation differentially regulate microRNA expression in human primary keratinocytes," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, article e83392, 2013.
- [41] H. Li, X. Han, K. Zuo et al., "miR-23b promotes cutaneous wound healing through inhibition of the inflammatory responses by targeting ASK1," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 50, no. 11, pp. 1104–1113, 2018.
- [42] K. S. Amr, F. S. Bayoumi, F. T. Elgengehy, S. O. Abdallah, H. H. Ahmed, and E. Eissa, "The role of microRNA-31 and microRNA-21 as regulatory biomarkers in the activation of T

- lymphocytes of Egyptian lupus patients,” *Rheumatology International*, vol. 36, no. 11, pp. 1617–1625, 2016.
- [43] D. Di Girolamo, R. Ambrosio, M. A. De Stefano et al., “Reciprocal interplay between thyroid hormone and microRNA-21 regulates hedgehog pathway–driven skin tumorigenesis,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 126, no. 6, pp. 2308–2320, 2016.
- [44] M. Zhou, X. Yu, Z. Jing, W. Wu, and C. Lu, “Overexpression of microRNA-21 inhibits the growth and metastasis of melanoma cells by targeting MKK3,” *Molecular Medicine Reports*, vol. 20, no. 2, pp. 1797–1807, 2019.
- [45] W. Fan, D. Liang, Y. Tang et al., “Identification of microRNA-31 as a novel regulator contributing to impaired interleukin-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 64, no. 11, pp. 3715–3725, 2012.
- [46] D. Li, X. I. Li, A. Wang et al., “MicroRNA-31 promotes skin wound healing by enhancing keratinocyte proliferation and migration,” *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 135, no. 6, pp. 1676–1685, 2015.
- [47] B. Zhou, X. X. Zuo, Y. S. Li et al., “Integration of microRNA and mRNA expression profiles in the skin of systemic sclerosis patients,” *Scientific Reports*, vol. 7, p. 42899, 2017.
- [48] H. Zhu, Y. Li, S. Qu et al., “MicroRNA expression abnormalities in limited cutaneous scleroderma and diffuse cutaneous scleroderma,” *Journal of Clinical Immunology*, vol. 32, no. 3, pp. 514–522, 2012.



Hindawi

Submit your manuscripts at
www.hindawi.com

