



---

---

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**

**TESIS:**

**“Niveles de células T reguladoras e IL-10 en mujeres con lupus eritematoso  
sistémico con y sin aterosclerosis subclínica”**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS E  
INVESTIGACIÓN**

**PRESENTA:**

**ISIS MARÍA REBECA GONZÁLEZ RAMÍREZ**

**DIRECTORES:**

**DC. MARIO GARCÍA CARRASCO**

**DC. CLAUDIA MENDOZA PINTO**

**MC. MARGARITA MUÑOZ GUARNEROS**

*A mis hijos y mami.*

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca recibida durante mis estudios de maestría.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (**IMSS**) por su apoyo económico durante mi formación.

Al Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A todos y cada uno de los maestros de la maestría, por compartir su conocimiento y enriquecer el mío.

Al Dr. Mario García Carrasco, a las Dras. Margarita Muñoz, Claudia Mendoza Pinto y Socorro Méndez Martínez, por brindarme su apoyo, consejo, paciencia y confianza.

A mis compañeritos de equipo, Teo (Marco), Monse, Luz, Salvador, Viri y Erick por su apoyo y hacer de todo mas llevadero, y en especial a Pame por haberme ayudado a concluir este proyecto.

A Fety y Andrés, por su amor, apoyo y tiempo robado, a Helena por haber resistido junto a mí, y a Elías por su apoyo y amor.

A todas las pacientes con lupus con las que trabaje, por confiar en mí, y por su tiempo para que yo pudiera realizar este trabajo, mil gracias.

Al Cardiólogo Adalberto Ramírez Hernández, por su apoyo y enseñanza en la realización de los ultrasonidos carotídeos.

A Laboratorios clínicos de Puebla, al Dr. Alejandro Ruiz Argüelles, por permitirme realizar la parte experimental en sus instalaciones, a la química Beatriz Pérez Romano por su tiempo y conocimiento, y en especial a los chicos del laboratorio, los químicos: Anita, Omar, Liz y Karen por compartir su tiempo y espacio.

## INDICE

1.	ANTECEDENTES GENERALES .....	1
1.1	Lupus Eritematoso Sistémico .....	1
1.2	Patogénesis.....	1
1.3	Pronóstico.....	2
1.4	Aterosclerosis .....	3
1.5	Aterosclerosis en lupus eritematoso sistémico.....	4
1.6	Aterosclerosis subclínica .....	6
1.7	Diagnostico .....	6
1.8	Linfocitos T reguladores e IL-10 en la aterosclerosis.....	7
2.	ANTECEDENTES ESPECIFICOS.....	9
2.1	Aterosclerosis subclínica en lupus eritematosos sistémico .....	9
3.	JUSTIFICACIÓN.....	11
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	12
5.	HIPÓTESIS .....	12
6.	OBJETIVOS.....	13
6.1	Objetivo general .....	13
6.2	Objetivos específicos .....	13
7.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	14
7.1	Sujetos de estudio. ....	14
7.2	Procedimiento .....	14
7.3	Análisis de estadístico.....	15
7.4	Bioética .....	15
7.5	Recursos humanos.....	16
7.6	Recursos materiales.....	16
7.7	Recursos financieros.....	17
8.	RESULTADOS .....	18
8.1	Realización de ultrasonidos Doppler carotideo .....	18
8.2	IL-10 por método de ELISA .....	19
8.3	Linfocitos Treg por citometria de flujo .....	19
9.	DISCUSION.....	21

10.	CONCLUSIÓN .....	22
11.	FORTALEZAS.....	22
12.	DEBILIDADES.....	22
13.	OPORTUNIDADES .....	23
14.	ANEXOS.....	24
15.	REFERENCIAS .....	38

## RESUMEN

**Introducción:** El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, compleja, con etiología multifactorial, su respuesta inmunitaria es anómala y depende de la interacción con factores genéticos, medioambientales, la cual se caracteriza por el desarrollo de aterosclerosis subclínica durante su evolución, en cuyo proceso patogénico se ve influido por factores inmunológicos relevantes como las poblaciones linfocitarias

**Objetivo:** Determinar los niveles de IL-10 y linfocitos Treg en pacientes con LES con y sin aterosclerosis subclínica.

**Material y método:** Se realizó un ultrasonido carotideo a 66 pacientes, de los cuales 23 fueron diagnosticados con aterosclerosis subclínica, y 43 sin aterosclerosis subclínica, posteriormente se les realizó una toma de muestra sanguínea, con la finalidad de determinar niveles séricos de linfocitos Treg e IL-10. La actividad de la enfermedad evaluada por el instrumento MEXSLEDAI.

Se utilizó estadística descriptiva (promedio, DE, porcentajes). Estadística inferencial: prueba T de student y Chi cuadrada para comparación de variables cuantitativas y cualitativas, respectivamente.

**Resultados:** Se incluyeron 66 mujeres, 23 con aterosclerosis y 43 sin aterosclerosis. Los linfocitos T reguladores fenotipo ( $CD4^+CD25^+CD45RA^+FOXP3^{low}$ ) se encontraron en mayor cantidad en el grupo de pacientes con aterosclerosis comparado con pacientes sin aterosclerosis (5,4130 cél/ul vs 1,8549 cél/ul;  $p= 0.001$ ). En el presente estudio no se encontró diferencia significativa ( $p. = 183$ ) en los niveles de IL-10 en pacientes con LES con y sin aterosclerosis subclínica.

**Conclusión:** En mujeres con LES, los linfocitos T reguladores fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>low</sup> se encontraron en mayor cantidad en pacientes con LES con aterosclerosis versus pacientes sin aterosclerosis

## **1. ANTECEDENTES GENERALES**

### **1.1 Lupus Eritematoso Sistémico**

EL Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica, crónica e inflamatoria, de etiología desconocida que se caracteriza por una alteración de la tolerancia inmunológica a antígenos nuclear y al desarrollo de complejos autoinmunes. Sus manifestaciones clínicas implican la participación de múltiples órganos incluyendo riñones, articulaciones, sistema nervioso y órganos hematopoyéticos (1).

El LES es una enfermedad que afecta a personas de todas las edades, grupos étnicos y ambos sexos, sin embargo más del 90 % de los pacientes con LES, son mujeres en edad reproductiva (2). La incidencia del LES es aproximadamente de 1 a 10 por cada 100,000 personas-años y su prevalencia es de 20 a 70 por cada 100,000 personas (3).

### **1.2 Patogénesis**

La etiología del LES es desconocida, sin embargo múltiples factores de riesgo genéticos, epigenéticos, y ambientales, han sido asociados. Numerosas anomalías inmunológicas contribuyen a la patogénesis del LES, que incluyen alteraciones en la limpieza de células apoptóticas, pérdida de tolerancia a auto-antígenos, activación aberrante de linfocitos T y B, perfil de citocinas alterado y producción patogénica de auto-anticuerpos (4).

Dentro de los factores genéticos, se observado que mutaciones genéticas en C1q determina bajos niveles de C2 y C4, que son asociados a un incremento en el riesgo de desarrollar LES. Por otra parte un aumento en la actividad genética del IFN- $\alpha$  también ha sido descrita como un factor de riesgo heredable para LES. En pacientes con lupus se han reportado una capacidad reducida en la metilación de DNA de varios genes, y en consecuencia una sobre expresión de proteínas inflamatorias como CD11a, CD70, CD40. La sobre expresión de la perforina en conjunto con una hipometilación de genes, es responsable de una actividad anormal de linfocitos T CD4 citotóxicos (5, 6).

Dentro de los factores hormonales se ha observado que mujeres con LES tiene niveles incrementados de estrógenos y niveles reducidos de andrógenos, probablemente por un incremento en la actividad de la aromatasa, una enzima que convierte los andrógenos en estrógenos. Se ha observado que la actividad de la enfermedad se vea aumentada cuando hay un incremento en los niveles circulantes de prolactina, ya que esta hormona es bien conocida por sus efectos estimulantes sobre el sistema inmune, especialmente en los linfocitos B (5).

En los factores ambientales la exposición solar es un factor que contribuye al desarrollo de LES, ya que la luz UV induce apoptosis de queratinocitos y causa translocación de auto antígenos desde compartimiento celulares, hasta la superficie de membrana de células apoptóticas, además la luz UV incrementa la producción de citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  por linfocitos y queratinocitos. Una infección por el virus Epstein Barr podría estar ocasionando una reacción cruzada entre auto antígenos y su antígeno nuclear 1, la actividad constante por este virus podría estar promoviendo una continua producción de IFN-I y regulando la expresión de los receptores Toll-like (5, 7).

### **1.3 Pronóstico**

El pronóstico para los pacientes con LES depende de la variabilidad clínica de la enfermedad, variando individualmente en función de la gravedad de la misma. Durante las últimas décadas la expectativa de vida de las personas con LES ha mejorado notablemente con una tasa de supervivencia del 90% a 10 años; sin embargo una de las complicaciones para estos pacientes son las enfermedades cardiovasculares (ECV), esto a causa de un acelerado y aumentado desarrollo de aterosclerosis, la cual es reconocida como la mayor causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con LES (8).

#### 1.4 Aterosclerosis

La Aterosclerosis es una enfermedad progresiva inflamatoria que afecta arterias de grande y mediano grosor, que está definida como el proceso de formación de placa y estenosis en vasos arteriales. Los efectos dañinos de la ruptura de la placa incluyen la oclusión vascular aguda y complicaciones trombo-embolicas como infarto al miocardio y derrame cerebral debido a la formación de placa en la arteria carótida. Esta patología, es considerada no solo un desorden de acumulación de lípidos en la pared arterial, sino una enfermedad crónica inflamatoria que comprende componentes del sistema inmune innato y adaptativo (9).

La aterosclerosis inicia con el depósito de colesterol de baja densidad (LDL) en la pared arterial, esto comúnmente resultado de una serie de factores que contribuyen al desarrollo de esta (Tab. 1) (10). El LDL acumulado es oxidado, resultando en la formación de LDL oxidado (OxLDL), esto ha sido sugerido como el evento crítico en el proceso inflamatorio de la pared vascular. Monocitos migran hacia la pared arterial a través de moléculas de adhesión, liberando citocinas pro-inflamatorias. Los componentes proteicos del OxLDL son presentados por macrófagos y células dendríticas a los linfocitos T, para su diferenciación en células T efectoras (Th1, Th2 y Th17) estimulando la secreción de citocinas y quimiocinas, y la proliferación de células musculo liso (SMCs), las cuales junto con las células espumosas contribuyen a la formación de la placa aterosclerótica y fibrosis endotelial (11).

Tabla 1. Factores de riesgo que contribuyen el desarrollo de aterosclerosis
Hipertensión arterial
Diabetes Mellitus
Obesidad
Tabaquismo
Niveles séricos elevados de lipoproteínas de baja densidad
Niveles séricos bajos de lipoproteínas de alta densidad
Sedentarismo
Genética ( antecedentes familiares )

Edad ( mayor de 55 años en hombres , mayor de 65 años en mujeres )
--

Estados inflamatorios sistémicos
----------------------------------

Por lo anterior, cada vez es más evidente que la inflamación crónica y desregulación inmune juegan papeles importantes en el desarrollo de la aterosclerosis.

### **1.5 Aterosclerosis en lupus eritematoso sistémico**

La aterosclerosis es una patología que se acentúa en pacientes con enfermedades autoinmunes; diversos estudios han demostrado aumentos en el grosor de la íntima-media, la placa carotidea, y calcificaciones de arterias coronarias en pacientes con síndrome antifosfolipidos, lupus eritematoso sistémico, y artritis reumatoide, comparados con grupos controles (12).

Urowitz y col. Describieron un patrón bimodal de mortalidad en pacientes con LES, el cual hace referencia a la existencia de un primer pico en el que los pacientes mueren en una etapa temprana de la enfermedad, debido a la actividad del lupus y a una alta incidencia de infecciones; y un segundo pico, en el que los pacientes mueren en etapas tardías de la enfermedad, en el que el lupus se encuentra inactivo pero las muertes se deben a una alta incidencia de infarto al miocardio, a causa un proceso de aterosclerosis (13).

Bulkley y Roberts fueron los primeros en sugerir una asociación entre la terapia a largo plazo con corticoesteroides y un acelerado desarrollo de aterosclerosis en pacientes con lupus. Petri y col. Observaron que una dosis de 10 mg de corticosteroides en pacientes con LES se asocia a un aumento en los niveles de colesterol, presión arterial y peso (14, 15). Diversos estudios de cohorte han relacionado el uso prolongado de glucocorticoides y una mayor dosis acumulada, con elevada incidencia de aterosclerosis y ECV en pacientes con LES (16,17).

Los factores de riesgo tradicionales de Framingham son los mismos para los pacientes con LES y la población general; sin embargo se han identificado factores de riesgo específicos para pacientes con lupus, algunos relacionados con la actividad y manejo de la enfermedad (tab. 2); altos niveles de lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos, así como niveles bajos de HDL han sido descritos en pacientes con la enfermedad activa (16,17).

Tabla 2. Factores de riesgo específicos en pacientes con LES (15)

Duración y actividad de la enfermedad
Afectación renal
Terapia con glucocorticoides
Anticuerpos antifosfolipidos
Anti-inflamatorios no esteroideo
Deficiencia de vitamina D
Proteína C reactiva

Los últimos datos de la cohorte Hopkins, estiman el riesgo de acontecimientos cardiovasculares en pacientes con LES 2.66 veces más alto en comparación con la población general (15). Además de un aumento de riesgo cardiovascular, aquellos pacientes con LES que han sufrido un ECV tienen peores desenlaces, con un aumento en la mortalidad y prolongada estancia hospitalaria, en comparación a pacientes diabéticos y pacientes sin LES (18). Los riesgos cardiovasculares de Framingham no engloban los riesgos en su totalidad para las pacientes con LES, impresionantemente para los pacientes con LES después de realizar un ajuste con los factores tradicionales presentaron: RR de 10.1 para infarto al miocardio no fatal, 17 para muerte secundaria a enfermedad coronaria, 7.5 para todas las enfermedades coronarias y 7.9 para infartos cerebrales (15).

Los pacientes con LES, tienen mayor riesgo de sufrir ECV, en comparación con la población general, hecho que no puede ser sustentado, únicamente con los factores de riesgo tradicionales, lo que sugiere que la inflamación crónica asociada a estas condiciones,

podieran acelerar el desarrollo de aterosclerosis y conducir a una mayor morbilidad y mortalidad cardiovascular (19)

### **1.6 Aterosclerosis subclínica**

La aterosclerosis subclínica (AS) se presenta con años de anterioridad a las manifestaciones clínicas, por lo que ha sido objeto importante de estudio y sirve como un marcador predictivo de susceptibilidad a enfermedades cardiovasculares (ECV).

La identificación de individuos con aterosclerosis subclínica puede alertar al médico mientras el paciente se encuentra aún asintomático, permitiéndole poner en práctica medidas preventivas para el control de los factores de riesgo. Diversos estudios han demostrado que la aterosclerosis es regresiva si se detecta en esta etapa, disminuyendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares (20).

### **1.7 Diagnóstico**

El grosor de la íntima-media (IM) carotídea es probablemente el marcador más sensible para detección de aterosclerosis en etapas tempranas, y es considerado un indicador de aterosclerosis en general (21). La IM carotídea es mundialmente utilizada por ser simple, reproducible y su medición es no invasiva (22).

El Ultrasonido Doppler carotídeo es un método que permite evaluar no solo la IM carotídea, sino también la presencia y características de la placa, así como la severidad de estenosis en la carótida. (22). El ultrasonido carotídeo es método no invasivo y permite la evaluación y el seguimiento de la aterosclerosis subclínica, el cual está avalado por la Asociación americana del corazón (23). De acuerdo a los criterios ecográficos, la íntima-media se considera normal cuando es  $\leq 0.9$  mm, con engrosamiento cuando es  $> 0.9$  mm e indicativo de placa cuando es  $> 1.3$  mm (17). En un reciente meta-análisis Lorenz y col. Concluyeron

que un aumento de la IM carotidea es un fuerte indicador predictivo de evento cardiovascular (24).

### **1.8 Linfocitos T reguladores e IL-10 en la aterosclerosis**

Los linfocitos T reguladores (Treg) desempeñan un papel crucial en el mantenimiento inmunológico, la auto tolerancia, la protección de enfermedades autoinmunes, así como regulando la respuesta inmune frente a diferentes patógenos (25). Los linfocitos Treg se caracterizan por la expresión de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y el factor de transcripción Foxp3. Sin embargo por el hecho de que Foxp3 es una molécula intracelular, se han utilizado otros marcadores de superficie para la caracterización de los linfocitos Treg, tales como CD127, CD26, CD39, CD45RA, CD49d, CD101, CD194 los cuales han sido descritos y su significancia por distinguir a los linfocitos Treg de otros linfocitos aun es discutida (26).

Estudios recientes han demostrado que la desregulación de los linfocitos T reguladores, es uno de los mayores factores que confieren riesgo para la expresión de enfermedades autoinmunes, como el Lupus eritematoso sistémico y para inflamación crónica como la aterosclerosis (27, 28).

En 2006 Ait-Oufella y Col. Fueron los primeros en demostrar, que un aumento en el tamaño de la lesión aterosclerótica, estaba directamente relacionado con una disminución de linfocitos Treg periféricos, en ratones ateroscleróticos (29). Estudios recientes sugieren que los linfocitos Treg, intervienen activamente en la tolerancia inmunológica e inhiben el desarrollo o progresión de la aterosclerosis, mediante la regulación negativa de linfocitos T efectoros (30), además los linfocitos Treg pueden directamente inhibir el fenotipo proinflamatorio de macrófagos, resultando en una reducción en la formación de células espumosas y la diferenciación de macrófagos con un fenotipo anti inflamatorio M2. También regulan directamente la activación de células endoteliales y el reclutamiento de leucocitos independientemente de su función supresora en los linfocitos T efectoros (31). Se ha especulado que la acción antígeno específica de los linfocitos Treg es producida en

respuesta a un número alterado de auto antígenos propios como LDL, epitopes oxidados de células apoptóticas y HSP 65/60, que disminuyen la inflamación dentro de las placas ateroscleróticas (30).

Los linfocitos Treg participan en la supresión de los linfocitos Th1 los cuales tienen características pro-aterogénicas, ya que se ha observado, desempeñan un papel importante, en el proceso aterogénico, en humanos como en modelos murinos. Los linfocitos Treg, realizan funciones inmunosupresivas, mediante diferentes mecanismos. Uno de estos mecanismos es la secreción de interleucinas antiinflamatorias como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35. Estudios recientes, han encontrado un potencial papel protector de la IL-10 y TGF- $\beta$ , en el desarrollo de la aterosclerosis (32).

La presencia de IL-10 ha sido demostrada en las placas ateroscleróticas humanas y su papel ha sido ampliamente establecido, en modelos murinos de aterosclerosis. La inactivación genética o el bloqueo de IL-10 o TGF- $\beta$  con anticuerpos neutralizantes, agrava la aterosclerosis en ratones, con un aumento en la inflamación vascular y exacerbación patológica de la respuesta Th1 y Th2. La deficiencia IL-10, en ratones alimentados con una dieta aterogénica promueve lesiones ateroscleróticas tempranas, caracterizadas por la infiltración aumentada, de células inflamatorias, particularmente linfocitos T activados, y la producción incrementada de interleucinas proinflamatorias. Contrariamente la sobreexpresión sistémica o local de IL-10 por transferencia génica adenoviral, en un modelo murino de aterosclerosis carotídea, fue encontrada sumamente eficiente en la prevención de la aterosclerosis (31, 33)

## **2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS**

### **2.1 Aterosclerosis subclínica en lupus eritematosos sistémico**

Lesiones prematuras de aterosclerosis en pacientes con LES fueron observadas por primera vez en los estudios de autopsia realizados por Bulkley y Roberts en 1975, y posteriormente confirmada por Urowitz en 1976. Desde entonces manifestaciones prematuras de aterosclerosis clínica y subclínica han sido demostradas en pacientes con LES por diversos grupos (34).

Diferentes métodos han sido utilizados para evaluar la aterosclerosis subclínica en pacientes con LES. En un estudio transversal, Romano y col. compararon 197 pacientes de LES y 197 controles, utilizando ultrasonido carótideo, encontraron que la placa aterosclerótica se presentaba en el 37 % de pacientes con SLE, comparado a un 15 % del grupo control; posteriormente en un estudio longitudinal complementario de esta cohorte, la aterosclerosis se había desarrollado o progresado en un promedio de 10 % por año en los pacientes con LES (35). Asanuma y col. En su cohorte de estudio encontraron un incremento en la prevalencia, de aterosclerosis subclínica utilizando tomografía automatizada, como instrumento de prueba, y observaron calcificación coronaria en el 30% de pacientes con LES, en comparación al 9% de los controles (16). De igual manera Manzi y col. encontraron aterosclerosis carotidea subclínica en el 40 % de su cohorte de estudio y que estas mujeres tienen 50 veces mayor riesgo de sufrir infartos agudos al miocardio (36). En un reciente estudio prospectivo observacional Kao y colaboradores, encontraron que tanto la íntima media carotidea y la presencia de placa fueron predictivos para futuros eventos ECV en pacientes con LES, independientemente de los factores de riesgo y la medicación (37).

Zhu y col. Realizaron un estudio, en el que compararon los niveles de IL-10 y linfocitos Treg, en pacientes con LES y pacientes con LES más aterosclerosis (Tab. 3) concluyendo que la reducción de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3, induce a una respuesta inmune patológica, que provoca la inflamación requerida para la formación de placa y el desarrollo de

aterosclerosis, evidenciando el papel protector de los linfocitos Treg frente a la aterosclerosis (38).

Tabla 3. Niveles de IL-10 y linfocitos Treg en pacientes con LES y pacientes con LES+AS		
Diagnostico	IL-10	Treg
LES	24.32±3.52	1.04±0.29
LES y Aterosclerosis	11.94±1.61	0.57±0.22

El desequilibrio células proinflamatorias y linfocitos Treg, promueve el desarrollo de la aterosclerosis, actualmente se están desarrollando nuevas estrategias para la prevención de esta enfermedad, las cuales tienen como principal objetivo la inducción de linfocitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3) (39).

El aumento de linfocitos Treg, se ha observado, induce la regresión de la aterosclerosis, e inhibe la progresión de aneurismas. Por otra parte los linfocitos Treg, además de suprimir la función efectora de los linfocitos T reactivos, suprimen la respuesta inmune de las células endoteliales, inducen macrófagos antiinflamatorios, inhiben a las células espumosas e influyen en el metabolismo del colesterol (11). Por lo tanto los linfocitos Treg podrían ser una importante herramienta para la prevención y tratamiento de ECV

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Las ECV representan, una de las principal causas de morbi-mortalidad en pacientes con LES. Los últimos datos de la cohorte Hopkins, estiman el riesgo de acontecimientos cardiovasculares en pacientes con lupus es 2.66 veces más alto en comparación con la población general. La presencia de ECV en pacientes con LES es independiente a los factores de riesgo tradicionales, por lo que otros mecanismos inflamatorios y autoinmunes pudieran contribuir a la progresión acelerada de aterosclerosis. Por lo tanto es necesario realizar estudios que identifiquen mecanismos inmunológicos, que pudieran estar participando en la patogénesis, de la aterosclerosis

Hasta el momento en México no existen, estudios clínicos que evalúen el impacto de los niveles de linfocitos Treg e IL- 10 en pacientes con LES y aterosclerosis subclínica. El determinar, si existe una relación en la disminución de los linfocitos Treg e IL-10, previo a las manifestaciones clínicas de la aterosclerosis, permitiría implementar medidas preventivas en el desarrollo de esta y serviría como un valor predictivo de susceptibilidad de ECV.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Diversos estudios han demostrado una disminución de linfocitos Treg e IL-10 durante el desarrollo y progreso esta patología.

Actualmente se sabe que los linfocitos Treg y la IL-10 desempeñan un papel importante en el control de la formación y progresión de la aterosclerosis. Estudios experimentales han demostrado que los linfocitos Treg intervienen activamente en la tolerancia inmunológica e inhiben el desarrollo o progresión de la aterosclerosis, mientras que la IL-10 es un factor protector para el desarrollo de la misma.

La aterosclerosis subclínica sirve como un marcador predictivo de susceptibilidad a ECV, sin embargo aún se desconoce la relación entre esta y los niveles de linfocitos Treg e IL-10, las cuales pudieran empezar a presentar alteraciones. Ante la problemática descrita, surge la siguiente pregunta de investigación.

**¿Existe diferencia en los niveles de linfocitos T reguladoras e IL-10 en mujeres con lupus eritematoso sistémico con y sin aterosclerosis subclínica?**

#### **5. HIPÓTESIS**

Los niveles de células T reguladoras e IL-10 son diferentes en mujeres con LES y aterosclerosis subclínica en comparación a mujeres con LES y sin aterosclerosis subclínica.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Comparar los niveles de células T reguladoras e IL-10 en mujeres con lupus eritematoso sistémico con y sin aterosclerosis subclínica.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Comparar los niveles de células T reguladoras en mujeres con lupus eritematoso sistémico con y sin aterosclerosis subclínica.
2. Comparar los niveles de IL-10 en mujeres con lupus eritematoso sistémico con y sin aterosclerosis subclínica.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

Este es un estudio de investigación transversal, comparativo, observacional, que se llevó a cabo en la Unidad de Investigación de enfermedades Autoinmunes Sistémicas del Hospital General Regional No. 36 (HGR-36) y en el Laboratorio de Inmunología experimental de Laboratorios Clínicos de Puebla, en el periodo comprendido de Agosto 2014 a Abril de 2016.

Este proyecto fue revisado y autorizado por el comité local de ética e investigación del HGR-36 del Instituto Mexicano del Seguro social, con número de registro R-2015-2102-1, de igual manera fue enviado y aceptado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la BUAP, con número de registro 362, numero de libro 2, numero de hoja 9. Este proyecto cuenta con financiamiento por parte del Instituto Mexicano del seguro social FIS/IMSS/PROT/G13/1198

### **7. 1 Sujetos de estudio.**

Los sujetos de estudio fueron pacientes que acuden al servicio de reumatología con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico según los criterios de clasificación del American College of Rheumatology (ACR).

### **7. 2 Procedimiento**

Se invitó a participar a las pacientes que acudan a la consulta externa del servicio de reumatología del HGR-36 con el diagnóstico de LES que tuvieran como criterios de inclusión: edad entre 18 y 50 años y a las que se evaluaría con o sin aterosclerosis subclínica; y como criterios exclusión: pacientes con: embarazo, con antecedente de eventos vasculares: coronarios, cerebrales y periféricos, infección aguda al momento del estudio, Tabaquismo (actual o 6 meses antes del estudio), diabetes Mellitus, Obesidad (IMC mayor o igual a 30).

Se les explico de manera detallada los objetivos de esta investigación, los estudios a los que fueron sometidos (Anexo 3), así como los beneficios y riesgos del mismo; a las

pacientes que aceptaron participar firmaron la hoja de consentimiento informado (Anexo 1), y se les realizó una entrevista estructurada con el fin de obtener datos demográficos, clínicos y de tratamiento (Anexo 2).

A las pacientes seleccionadas se les realizó un ultrasonido Doppler carotideo (Anexo 4) para el diagnóstico de aterosclerosis subclínica, dividiéndolas en dos grupos: controles, pacientes sin aterosclerosis subclínica y casos, pacientes con aterosclerosis subclínica. Posteriormente se les realizó una toma de muestras de sangre a las pacientes de ambos grupos, para la determinación de Treg e IL-10 (Anexo 5 y 6), al mismo tiempo se les realizó el índice de actividad de lupus MEX-SLEDAI (Anexo 7), para la actividad de la enfermedad. Las pacientes que no concluyeron todo el estudio fueron eliminadas.

### **7.3 Análisis de estadístico**

Se realizarán todas las estimaciones estadísticas en el programa SPSS versión 22.0 para windows. Para estadística descriptiva se utilizará frecuencias, mediana, porcentajes media. Para la comparación de los grupos evaluados se utilizará T-Student para los datos con una distribución normal y la prueba U de Mann-Whitney para datos con una distribución no normal, con un valor de  $p < 0.05$ , Chi cuadrada para comparar variables cualitativas.

### **7.4 Bioética**

Este proyecto fue enviado para revisión y autorización al comité local de ética e investigación del Hospital General Regional-36 del Instituto Mexicano del Seguro social, el cual fue aceptado con número de registro FIS/IMSS/PROT/G13/1198, también ha sido enviado al Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la BUAP para su evaluación.

El presente estudio se basa en los principios básicos de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial Brazil-2013, en cuanto a los requisitos científicos y protocolos de investigación para la investigación en seres humanos, la privacidad y confidencialidad

de los datos de las personas participantes, así como la participación de personas capaces de dar su consentimiento informado y que acepten de manera voluntaria participar en la investigación médica.

En base a la Ley General de Salud: TÍTULO QUINTO Para la investigación en seres humanos, artículos 96 y 100, para la implementación de acciones que contribuyan al desarrollo científico y las bases para la investigación en humanos.

En base a la ley general de salud en materia de investigación TITULO SEGUNDO De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I, Artículos 17, esta es una investigación con riesgo mayor que el mínimo debido a la utilización del ultrasonido Doppler.

En base a la NORMA oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, que establece los requisitos que se deben satisfacer para la organización y el correcto funcionamiento de los laboratorios clínicos.

#### **7.5 Recursos humanos.**

Los investigadores participantes en este estudio están adscritos al H.G.R. 36 del IMSS, a la Docencia de la Facultad de Medicina de la B.U.A.P. y a la División de Investigación y Estudios de Posgrado de la misma Universidad, DC. Mario García Carrasco, DC. Claudia Mendoza Pinto, MC. Margarita Muñoz Guarneros, la alumna de la MCMi LBM. Isis María Rebeca González Ramírez, el Dr. Adalberto Ramírez Hernández quien realizara los Ultrasonidos carotideos, así como Químicos y Laboratoristas de Laboratorios Clínicos de Puebla.

#### **7.6 Recursos materiales.**

Se contó con la infraestructura otorgada por las instituciones participantes H.G.R.36 del IMS, para el consultorio médico, Laboratorios Clínicos de Puebla: material y equipo de

laboratorio para procesamiento de las muestras, y el ecógrafo y material necesario para la realización del ultrasonido por parte del cardiólogo.

### **7.7 Recursos financieros**

Financiamiento del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social  
FIS/IMSS/PROT/G13/1198

Beca CONACyT e IMSS para la alumna de maestría.

## 8. RESULTADOS

Para el presente proyecto se invitó a participar a 90 mujeres, de las cuales se seleccionó 75, quienes cumplían con los criterios de inclusión, sin embargo solo 66 pacientes completaron los estudios.

### 8.1 Realización de ultrasonidos Doppler carotideo

Se realizó el ultrasonido Doppler carotideo a 66 pacientes con el fin de conformar los grupos de estudio, de las cuales 23 fueron diagnosticadas con aterosclerosis subclínica, y 43 sin aterosclerosis.

Al mismo tiempo se realizó una entrevista a las pacientes y revisión de su expediente para recabar los datos clínicos más importantes (Tab. 4).

Tabla 4. Características de las pacientes de ambos grupos

	LES + AS n=23	LES n=43
Edad	36.7	37.4
IMC	25.81	25.52
HAS, (n)	5	4
TEE (años)	10.5	10.5
Estatinas, (n)	0	5

IMC: Índice de masa muscular, HAS: Hipertensión arterial sistémica, TEE: Tiempo de evolución de la enfermedad

Se realizó una toma de muestra sanguínea a las 63 pacientes para la cuantificación de linfocitos T reguladores e IL-10, al mismo tiempo que se les realizó el índice de actividad de lupus MEX-SLEDAI, considerando un puntaje  $\leq 4$  sin actividad y  $>4$  con actividad.

En el grupo con LES +AS solo 3 pacientes presentaban el lupus activo, mientras que en las pacientes con LES, solo 2 presentaba la enfermedad activa.

### 8.2 IL-10 por método de ELISA

El suero de las 66 pacientes fueron depositadas en una placa de ELISA, la cual contenía anticuerpos IL-10. Los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa ( $p=.183$ ) en los niveles de IL-10 entre ambos grupos (Tab. 5).

Tabla 5. Niveles séricos de IL-10

	LES + AS (n=23)	LES (n=46)	
IL-10	14.97 (pg/ml)	17.24 (pg/ml)	$p=.183$

### 8.3 Linfocitos Treg por citometria de flujo

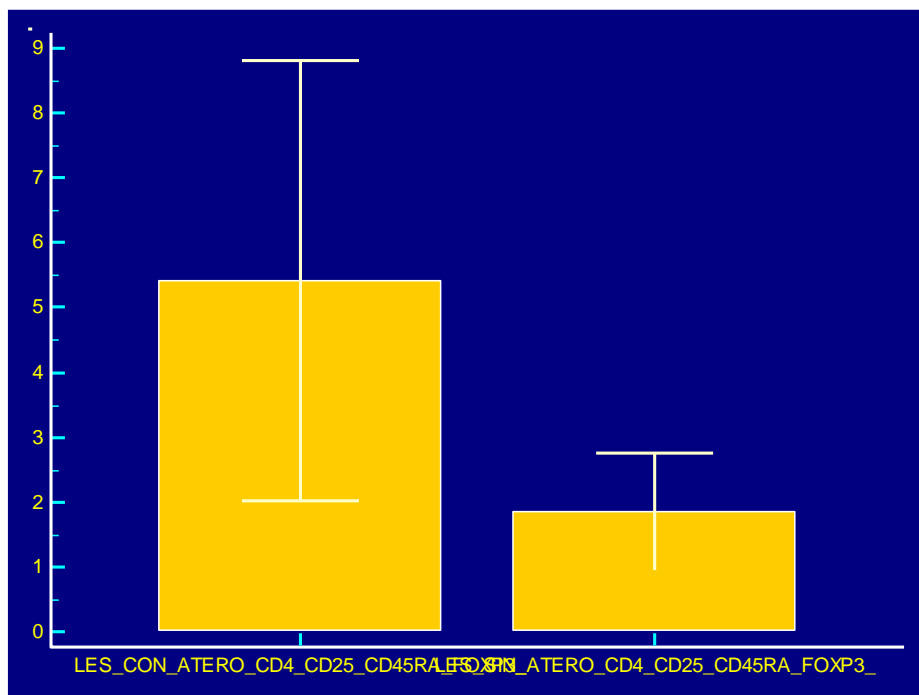
Se realizó la tinción de los linfocitos Treg con los marcadores de superficie CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> y los marcadores citoplasmáticos FoxP3 y HELIOS.

En los linfocitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup>) no se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos (Tab. 6). Por otra parte también se analizaron otras subpoblaciones de linfocitos Treg, encontrando solo una diferencia significativa en el fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>low</sup> (5,4130 cél/uL vs 1,8549 cél/uL;  $p= 0.001$ ) (Grafico 1).

Tabla 6. Linfocitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup>).

Población celular (LES + AS)	N	Media
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>+</sup> HELIOS <sup>+</sup>	23	3.35cel/ul
Población celular (LES)	N	Media
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>+</sup> HELIOS <sup>+</sup>	43	1.51 cel/ul

Grafico 1. Comparación de la subpoblación de linfocitos Treg fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> en pacientes con LES con y sin AS.



## 9. DISCUSION

La evidencia actual sobre la importancia de las poblaciones linfocitarias en las enfermedades autoinmunes, es crucial para un adecuado entendimiento de los fenómenos de autoinmunidad presentes en la población aquejada por estos padecimientos. Los pacientes con LES presentan múltiples alteraciones fenotípicas y funcionales de linfocitos, las cuales tienen relevancia en la diferenciación de las poblaciones con propiedades inmunorreguladoras o tolerogénicas, como es el caso de los linfocitos Treg, en los cuales su número y función aún es contradictorio (32, 40).

En nuestro estudio no se observó una diferencia significativa en los niveles de linfocitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) e IL-10 en pacientes con LES con y sin aterosclerosis subclínica. Esto posiblemente porque a nivel subclínico en la aterosclerosis no hay suficientes alteraciones inmunológicas que alteren a los linfocitos Treg e IL-10 en pacientes con LES; como ya ha sido demostrado por otros estudios, donde no se encontró asociación entre el nivel de linfocitos Treg y la aterosclerosis subclínica en controles sanos (41)

Por otra parte si se observó una diferencia significativa en la subpoblación de linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup>, o linfocitos Treg naive (nTreg). Estos linfocitos se observaron aumentados en el grupo de pacientes con LES y AS, en comparación con pacientes con LES sin AS. Niveles elevados de linfocitos nTreg se han encontrado en pacientes con LES activo y es asociado a la producción de citocinas pro inflamatorias como IL-6, IL-12 and TNF $\alpha$  (40), las cuales también se encuentran elevadas en placas ateroscleróticas. Hasta el momento no hay estudios evalúen el posible papel de los linfocitos nTreg en el proceso de aterosclerosis. Un dato interesante en nuestro resultados es que la mayoría de las pacientes en ambos grupos mantenían controlada la actividad de la enfermedad, solo el 7.5% de las pacientes presentaron el lupus activo al momento del estudio, por lo la actividad de la enfermedad podría estar influenciando directamente en los niveles de los linfocitos nTreg.

Nuestros hallazgos pudiesen ser atribuidos a las características funcionales de los linfocitos Treg y sus diversas subpoblaciones en pacientes con lupus eritematoso sistémico, ya que esta población celular puede poseer diversas funciones, dependiendo del estímulo que favorezca su proliferación y diferenciación, aunado esto a un proceso de aterosclerosis las características de estos linfocitos podrían modificar el funcionamiento de estos linfocitos.

## **10. CONCLUSIÓN**

En mujeres con LES, los linfocitos T reguladores fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>low</sup> se encontraron aumentados en pacientes con aterosclerosis subclínica versus pacientes sin aterosclerosis subclínica, probablemente debido a alteraciones funcionales de los linfocitos T reguladores y sus subpoblaciones

En el presente estudio no se observó una diferencia significativa tanto en los niveles de linfocitos Treg, como de IL-10 mujeres con LES con y sin aterosclerosis subclínica

## **11. FORTALEZAS**

La oportunidad de realizar un estudio piloto en una población con posibilidad de seguimiento y controles adecuados por médicos reumatólogos e inmunólogos experimentados para conocer las características fenotípicas de las poblaciones de linfocitos T reguladores, para un mejor entendimiento de los mecanismos autoinmunitarios en la enfermedad cardiovascular subclínica de pacientes con lupus eritematoso sistémico.

## **12. DEBILIDADES**

La principal debilidad del estudio el tamaño de la muestra y la ausencia de un grupo de controles sanos para contrastar las diferencias en controles sanos con y sin aterosclerosis.

No se investigó el apego a tratamiento farmacológico.

Los resultados no pueden ser generalizados a todas las pacientes con LES, por lo que es necesario incrementar el número de pacientes para poder corroborar los hallazgos.

La importancia de esta población celular es limitada ya que múltiples factores inmunológicos modifican de forma significativa esta población.

### **13. OPORTUNIDADES**

La oportunidad de tener un seguimiento estrecho con este grupo de pacientes por la facilidad por parte del Instituto Mexicano del Seguro Social, respecto a los controles propios de la enfermedad reumática.

Abrir nueva línea de investigación respecto a los cambios fenotípicos en lupus eritematoso sistémico como posibles biomarcadores tempranos de enfermedad cardiovascular subclínica.

## 14. ANEXOS

### Anexo 1

	<b>INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLITICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD</b>  <b>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	Fecha:
<b>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN</b>		
Nombre del estudio	Niveles de las células T reguladoras e IL-10 en mujeres con LES con y sin aterosclerosis subclínica.	
Patrocinador externo (si aplica):		
Lugar :	Los pacientes serán seleccionados en la consulta de reumatología del Hospital General Regional No. 36, IMSS, Puebla. El ultrasonido carotideo se llevara a cabo en el hospital Betania, por el Dr. Adalberto Ramírez La toma de muestra sanguínea se realizara en laboratorios clínicos de Puebla, sucursal matriz.	
Número de registro:	FIS/IMSS/PROT/G13/1198	
Justificación y objetivo del estudio:	<p>Las ECV son una de las principal causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con LES. El riesgo de infarto al miocardio es 50 veces mayor en mujeres con LES en edades de entre 35 y 44 años. La presencia de ECV en pacientes con LES es independiente a los factores de riesgo tradicionales. La presencia de enfermedad cardiovascular en estos pacientes es independiente de los factores de riesgo tradicionales, por lo que otros mecanismos inflamatorios y autoinmunes pudieran contribuir a la progresión acelerada de aterosclerosis. Por lo tanto es necesario realizar estudios que identifiquen mecanismos inmunológicos que pudieran estar participando en la patología de la aterosclerosis</p> <p>El determinar si existe una relación en la disminución de los linfocitos Treg e IL-10 previo a las manifestaciones clínicas de la aterosclerosis, permitiría implementar medidas preventivas en el desarrollo de esta y serviría como un valor predictivo de susceptibilidad de ECV.</p>	

Procedimientos:	Entrevista con la paciente, realización de ultrasonido Doppler carotideo y toma de muestra sanguínea.	
Posibles riesgos y molestias:	Dentro de las maniobras a realizar dentro de este proyecto, el ultrasonido carotideo es un procedimiento no invasivo, que no representa riesgo alguno para la paciente. La toma de la muestra sanguínea, será un tubo de 5 ml. con el posible riesgo de dolor, enrojecimiento y equimosis.	
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Este proyecto será de beneficio para todas aquellas pacientes que sean detectadas con aterosclerosis subclínica, de manera que se les pueda ofrecer un tratamiento que sirve como medida preventiva para el desarrollo de la aterosclerosis y ECV.	
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	El resultado se les dará a las pacientes en la consulta y el tratamiento que se les otorgue será a consideración del doctor responsable.	
Participación o retiro:	El paciente tiene la libertad de retirarse del proyecto de investigación si así lo desea	
Privacidad y confidencialidad:	Los datos y resultados se mantendrán en privacidad y confidencialidad de los médicos responsables, y solo utilizados para cumplir con el objetivo del presente proyecto de investigación.	
En caso de colección de material biológico (si aplica):	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	No autorizo que se tome la muestra. Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio. Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.
Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):	Una vez obtenidos los resultados de los estudios realizados, el medico responsable, determinara si es necesario dara al paciente algun tipo de tratamiento necesario.	
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:		
Investigador Responsable:	Dr. Mario García Carrasco Celular: 2223233498 Mail: mgc30591@yahoo.com	
Colaboradores:	LBM. Isis María Rebeca González Ramírez Celular: 2224379837 Mail: rebekita_@live.com.mx	
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico:		

<hr/> Nombre y firma del paciente	<hr/> Dr. Mario García Carrasco Nombre y firma del investigador responsable
Testigo 1  <hr/> Nombre y firma	Testigo 2  <hr/> Nombre y firma
Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio	
<b>Clave: 2810-009-013</b>	

\* El presente estudio forma parte de un proyecto de investigación de una tesis de maestría.



No

Accidente cerebro vascular

Aneurisma

Esteroides: Dosis actual: \_\_\_\_\_mg Dosis acumulada: \_\_\_\_\_

Estatinas: Si No Intensidad: \_\_\_\_\_

Rosuvastatina, atorvastatina, rosuvastatina, pravastatina, lovastatina, simvastatin.

Colesterol: \_\_\_\_\_ LDL: \_\_\_\_\_ HLD: \_\_\_\_\_ Trigliceridos: \_\_\_\_\_

Ultrasonido doppler: Con AS Sin AS Vitamina D: \_\_\_\_\_

Linfocitos Treg: \_\_\_\_\_ IL-10: \_\_\_\_\_

### Anexo 3

#### Variables

Variable	Escala	Valor
Ateroesclerosis Subclínica	Dicotómica	Presente/Ausente
Células T reguladoras	Dimensional	cel/ul (FOXP3 CD4+CD25+)
IL-10	Dimensional	Pg/ml
Variables de ajuste		
Edad	Dimensional	Años
Uso de esteroides	Dimensional	Mg
Hipertensión arterial sistémica	Dimensional	MmHg
Índice de masa corporal	Dimensional	Kg/m <sup>2</sup>
Uso de estatinas	Dicotómica	Si/No

#### Definiciones operacionales

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional
Ateroesclerosis Subclínica	Se define placa aterosclerótica (carotídea) cuando se detecta una placa aterosclerótica en las arterias carótidas en forma no invasiva mediante imágenes ultrasónicas en modo bidimensional, con un ecógrafo.	Se considera placa aterosclerótica carotídea cuando se cumplan los siguientes requisitos: a) Espesor de la pared anormal (grosor de la intima-media > 0.9 mm). b) Estructura anormal (protrusión hacia la luz, pérdida de alineación con la pared adyacente). c) Ecogenicidad anormal de la pared.

Células T reguladoras	Las células T reguladoras son una subpoblación especializada de linfocitos T, caracterizadas por la expresión de CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> y el factor de transcripción Foxp3.	% de Linfocitos T reguladores (CD4+CD25+FOXP3)
IL-10	Citocina antiinflamatoria capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias por los linfocitos T y los macrófagos.	Concentración de IL-10 en suero (Pg/ml)
Edad	Tiempo de vida desde el nacimiento	Tiempo de vida desde el nacimiento, hasta la entrevista
Esteroides	Sustancia orgánica de naturaleza lipídica formada por un esqueleto primario de tipo esterol	Dosis de esteroides desde el inicio del tratamiento hasta la fecha la entrevista, reportada en gramos.
Hipertensión arterial sistémica	De acuerdo con los criterios de la Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-: padecimiento multifactorial caracterizado por aumento sostenido de la presión arterial sistólica, diastólica o ambas	Presión: $\geq 140/90$ mmHg
Índice de masa corporal (IMC)	El IMC es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos.	Peso corporal en kilogramos, dividido entre la estatura en metros elevada al cuadrado (kg/m <sup>2</sup> ). La clasificación utilizadas para categorizar el IMC según la OMS es: -desnutrición (<18.5 kg/m <sup>2</sup> ) -normal (18.5 a 24.9 kg/m <sup>2</sup> ) -sobrepeso (25.0-29.9 kg/m <sup>2</sup> ) -obesidad ( $\geq 30.0$ kg/m <sup>2</sup> ).
Estatinas	Fármacos empleados para la disminución del colesterol	Consumo de estatinas en algún momento de la evolución de la enfermedad

## **Anexo 4**

### **Adquisición de imágenes ecográficas**

El estudio se realizó por el especialista en ultrasonido Doppler carotideo, el Dr. Adalberto Ramírez Hernández, quien desconocía de los datos clínicos de los pacientes. Se realizó un estudio piloto para evaluar la concordancia intraobservador del evaluador.

Se realizó la evaluación de la estructura vascular, en forma no invasiva, de las arterias carótidas común derecha y común izquierda mediante imágenes ecográficas en modo bidimensional, obtenidas a través de un ecógrafo IU-22 (Philips.) con transductor lineal de 17 MHz de acuerdo al siguiente protocolo.

### **Protocolo de exploración de carótidas por ultrasonido con Doppler color**

1. Se pasa al paciente a la sala de ultrasonido pidiéndole que se coloque en decúbito dorsal con el cuello descubierto y un poco en extensión y se le pide que gire su cabeza hacia el lado izquierdo para empezar a valorar la carótida derecha.
2. Con un transductor lineal de alta resolución en modo "B" dinámico se coloca en posición longitudinal en hemicuello derecho para localizar la carótida derecha.
3. Se representa anatómicamente la carótida común derecha (CCD), bulbo y bifurcación mostrando la carótida externa e interna derecha.
4. En corte longitudinal se representa la carótida común derecha para medir la íntima media y valorar paredes.
5. Valorar si hay placas de ateromas y medir porcentaje de obstrucción en corte transversal.
6. Se representa anatómicamente la carótida común derecha con Doppler color para valorar permeabilidad y flujo.

7. Se representa con Doppler color y Angio-Doppler el tercio distal, medio y proximal de la carótida común derecha para valorar velocidad de flujo.
8. Se representa carótida externa derecha (CED) con Angio-Doppler y medir velocidad de flujo.
9. Se representa la carótida interna derecha (CID) con Angio-Doppler y medir velocidad de flujo en el tercio distal, medio y proximal.
10. Se valora Carótida izquierda en hemicuello izquierdo y cabeza girada hacia la derecha con el método antes mencionado.

Para detectar la presencia de placa aterosclerótica, definida como el engrosamiento localizado del espesor IM con respecto a los segmentos adyacentes, se evaluó un corte transversal las porciones proximales, media y distales a la bifurcación arterial accesibles a la exploración ecográfica. En forma simultánea, las imágenes ecográficas de ambas arterias carótidas comunes se digitalizaron y se almacenaron en disco para su análisis.

### **Medición del espesor íntima-media**

La medición de la IM se realizara una vez fijada la imagen arterial en la pantalla de la computadora, mediante la selección de un área de al menos 10 mm de longitud a lo largo de la pared posterior de la arteria, proximal a la bifurcación de las arterias carótidas comunes de ambos lados, a una distancia aproximada de tres centímetros de la división de flujos. Mediante el algoritmo de detección de bordes se evaluaran todos los puntos (píxeles) de la imagen seleccionada y se identificaran automáticamente las localizaciones de las inter fase sangre-íntima y media-adventicia. Posteriormente se calculara en forma automatizada el EIM como la media de todos los puntos sucesivos correspondientes a la distancia entre ambas líneas y se determinara el valor del diámetro arterial interno, con sus respectivos desvíos estándares

## Anexo 5

### Determinación de IL-10

Para determinar las concentraciones de IL-10 presentes en el plasma de pacientes se utilizara el kit comercial para ELISA de la IL-10 humana (Human IL-10 ELISA Kit II) cuya marca comercial es IBL internacional (Cat. No. 550613).

La prueba consiste de los siguientes pasos:

1. Lavar los micropozos 2 veces con el buffer de lavado
2. Depositar la dilución 1:1 del suero de pacientes y el buffer de ensayo
3. Agregar 50 µl de biotina-conjugada a todos los posos
4. Cubrir los micropozos e incubar a temperatura ambiente por 2 horas
5. Lavar los micropozos con buffer de lavado tres veces
6. Agregar 100 µl de estreptavidina a todos los micropozos
7. Cubrir los micropozos e incubar a temperatura ambiente por 1 hora
8. Vaciar y lavar los micropozos con buffer de lavado tres veces
9. Agregar 100 µl del sustrato de TMB a los micropozos
10. Incubar la microplaca a temperatura ambiente por 10 minutos
11. Agregar 100 µl de solución stop
12. Realizar la lectura a 450 nm.

## Anexo 6

### Citometria de flujo

Se utilizó el citometro Gallos de Beckman Coulter para la adquisición y análisis de los linfocitos Treg, con el programa KALUZA.

FL1:	Helios	Alexa fluor 488
FL2:	FoxP3	PE
FL3:	CD45Ra	PE Texas Red
FL4:	CD127	PerCy
FL5:	CD45	PC7
FL6:	CD25	APC
FL7:	CD4	Alexa fluor 700

### Protocolo de tinción

1. 150  $\mu$ l de sangre
2. Lisar directo
3. Centrifugar por unos 5 min a 1400 rpm y decantar
4. Resuspender con vortex, lavar con isotón 2 veces y resuspender en el sobrenadante.
5. Adicionar Ac. de membrana, incubar por 20 min.

CD4	A/700:	3 $\mu$ l
CD127	PerCy:	2 $\mu$ l
CD25	APC:	5 $\mu$ l
CD45Ra	PE Tx Red:	2 $\mu$ l
CD45	PC7:	3 $\mu$ l
6. Lavar con 1 ml. buffer de lavado, centrifugar por 5 min. decantar y resuspender.

7. Agregar 2ml de buffer A e incubar durante 5 min. centrifugar a 1400 rpm por 5 min. y decantar
8. Lavar las células con 2ml con solución de lavado, centrifugar a 1400 rpm por 5 min y decantar.
9. Agregar 500µl de buffer C e incubar por 30 min.
10. Lavar 2 veces las células con 2 ml de buffer de lavado y centrifugar a 1400 rpm por 5min.
11. Adicionar 3µl de FoxP3 y Helios A488 (vortex ligero), incubar por 30 min.
12. Lavar las células 2 veces con buffer de tinción y resuspender en 1ml.

Anexo 7

MEX-SLEDA

PUNTUACIÓN	DESCRIPCION	DEFINICIÓN
8	TRASTORNOS NEUROLÓGICOS	<p>Psicosis: incapacidad para realizar una actividad normal por alteraciones graves de la percepción de la realidad. Incluye alucinaciones, incoherencia, asociaciones marcadamente dispersas, deficiencia del contenido del pensamiento, pensamiento ilógico, conducta grotesca, desorganizada. Excluir fármacos, EVC, aterosclerosis.</p> <p>Convulsiones: inicio reciente. Excluir metabólicas, infecciosas o farmacológicas.</p> <p>Síndrome orgánico cerebral: afección de la función mental con alteración de la orientación, memoria u otras funciones intelectuales, de inicio rápido y datos clínicos fluctuantes.</p>
6	RENAL	<p>Cilindros hemáticos, granulados o eritrocíticos.</p> <p>Hematuria &gt;5 eritrocitos/campo. Excluir otras causas.</p> <p>Proteinuria: de inicio reciente &gt;0.5 g/dl en cualquier muestra.</p> <p>Incremento de creatinina &gt;5 mg/100 ml.</p>
4	VASCULITIS	<p>Ulceración, gangrena, nódulos dolorosos sensibles, infartos periungueales, hemorragias en astilla o biopsia o angiografía que confirme vasculitis.</p>
3	HEMÓLISIS	<p>Corroborado por anemia y aumento de bilirrubina indirecta.</p> <p>Trombocitopenia &lt;100,000.</p>
3	MIOSITIS	<p>Debilidad proximal/dolor asociado a elevación de las CPK/aldolasa o EMG sugestiva o miositis comprobada.</p>
2	ARTRITIS	<p>Más de dos articulaciones dolorosas y con signos inflamatorios.</p>
2	AFECCIÓN MUCOCUTÁNEA	<p>De comienzo reciente o recurrente. Úlceras bucales o nasales.</p>
2	SEROSITIS	<p>Pleuritis: dolor pleurítico o derrame o engrosamiento pleural.</p> <p>Pericarditis: dolor pericárdico con al menos uno de los siguientes: roce, derrame, cambios electrocardiográficos o confirmación ecocardiográfica.</p>
1	FIEBRE O FATIGA	<p>&gt;38 °C, excluir infección.</p> <p>Fatiga que le impide realizar actividades cotidianas.</p>
1	LEUCO-LINFOPENIA	<p>&lt;3,000 leucocitos, descartar fármacos.</p> <p>&lt;1,500 linfocitos, descartar fármacos.</p>

Anexo 8

26/11/2015 Carta Dictamen

  **Dirección de Prestaciones Médicas**  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud 

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón".

**Dictamen de Autorizado**

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 2102  
HOSPITAL GENERAL REGIONAL NUM 36, PUEBLA

FECHA 26/11/2015

**DR. MARIO GARCÍA CARRASCO**

**PRESENTE**

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

**Niveles de células T reguladoras e IL-10 en mujeres con lupus eritematoso sistémico con y sin aterosclerosis subclínica**

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2015-2102-94

ATENTAMENTE



**DR.(A). CARLOS MARIO SANTAMARÍA NAAL**  
Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 2102

**IMSS**  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

## 15. REFERENCIAS

1. Garcia-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z. et al. (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci.Transl.Med.*, 3, 73ra20.
2. Cojocaru, I. M., Silosi, I., y Vrabie, C. D. (2011). Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica.(Buchar.)*, 6, 330-336.
3. Pons-Estel, G. J., Alarcon, G. S., Scofield, L., Reinlib, L., y Cooper, G. S. (2010). Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin.Arthritis Rheum.*, 39, 257-268.
4. Ohl, K., K. Tenbrock. (2015). Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* 45: 344–355.
5. Squatrito D., Emmi G., Silvestri E., Ciucciarelli L., D'Elios M.M., Prisco D., Emmi L. (2014) Pathogenesis and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus: From bench to bedside. *Auto Immun. Highlights.*5:33–45.
6. Deng Y, Tsao BP (2010) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 6(12):683–92.10
7. Kuhn A, Wenzel J, Weyd H (2014) Photosensitivity, apoptosis, and cytokines in the pathogenesis of lupus erythematosus: a critical review. *Clin Rev Allergy Immuno*
8. Bartels, C. M., Buhr, K. A., Goldberg, J. W., Bell, C. L., Visekruna, M., Nekkanti, S. et al. (2014). Mortality and cardiovascular burden of systemic lupus erythematosus in a US population-based cohort. *J.Rheumatol.*, 41, 680-687.
9. Patzelt, J., Verschoor, A., & Langer, H. F. (2015). Platelets and the complement cascade in atherosclerosis. *Front Physiol*, 6, 49.
10. Toth, P. P. (2008). Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it. *Int.J.Clin.Pract.*, 62, 1246-1254.
11. Yamashita, T., Sasaki, N., Kasahara, K., & Hirata, K. I. (2015). Anti-inflammatory and immune-modulatory therapies for preventing atherosclerotic cardiovascular disease. *J.Cardiol.*

12. Lopez-Pedreira, C. Aguirre, M.A., Barbarroja, & Cuadrado, M. J. (2010). Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches. *J Biomed Biotechnol.* 2010:607084.
13. Urowitz, M. B., Bookman, A. A., Koehler, B. E., Gordon, D. A., Smythe, H. A., & Ogryzlo, M. A. (1976). The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am.J.Med.*, 60, 221-225.
14. Manzi, S., Meilahn, E. N., Rairie, J. E., Conte, C. G., Medsger, T. A., Jr., Jansen-McWilliams, L. y col. (1997). Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am.J.Epidemiol.*, 145, 408-415.
15. Stojan, G. & Petri, M. (2013). Atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, 62, 255-262.
16. Asanuma, Y., Oeser, A., Shintani, A. K., Turner, E., Olsen, N., Fazio, S. y col. (2003). Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N.Engl.J.Med.*, 349, 2407-2415.
17. McMahan, M. & Skaggs, B. (2014) Pathogenesis and treatment of atherosclerosis in lupus. *Rheumatic Disease Clinics of North America.* 40(3):475–495
18. Shah MA, Shah AM, Krishnan E. (2009) Poor outcomes after acute myocardial infarction in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 36:570–575.
19. Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., y Hermoso, M. A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J.Immunol.Res.*, 2014, 149185.
20. Bhatt, S., Tandon, A., y Bhargava, S. (2013). Role of Imaging in Subclinical Atherosclerosis. *IMSA.*, 26, 31-34.
21. Fadda, S., Nassar, H., Gamal, S. M, & Al-Azizi, H. (2015). Subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus patients and its relationship to disease activity and damage indices. *Z Rheumatol.* Aug; 74(6):529-532.
22. Nezu, T., Hosomi. N., Aoki, S. & Matsumoto, M. (2016) Carotid Intima-Media Thickness for Atherosclerosis *J Atheroscler Thromb.* 6;23(1):18-31

23. Belibou, C., Ancuta, C., Ancuta, E., Filos, C., & Chirieac, R. (2012). Carotid intima-media thickness and plaque as surrogate biomarkers of atherosclerosis among consecutive women with systemic lupus erythematosus. *Rom.J.Morphol.Embryol.*, 53, 29-34.
24. Lorenz M. W., Markus H. S., Bots M. L., Rosvall M. & Sitzer M. (2007) Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 115, 459–467 (2007).
25. Long SA, Buckner JH. (2011) CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *J Immunol.*187(5):2061–6.
26. Jan Lastovicka (2013), "The Phenotypic Markers of CD4+CD25+ T Regulatory Lymphocytes," *Research in Immunology: An International Journal*, Vol. 2013 (2013), Article ID 119348, DOI: 10.5171/2013.119348
27. Tse K, Tse H, Sidney J, Sette A, Ley K. (2013) T cells in atherosclerosis. *Int Immunol.* 25: 615–622.
28. Himmel, M.E., MacDonald, KG., Garcia, R.V., Steiner, T.S. & Levings, M.K. (2013) Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J Immunol.* 190,5; 2001–2008
29. Ait-Oufella, H., Wang, Y., Herbin, O., Bourcier, S., Potteaux, S., Joffre, J. et al. (2013). Natural regulatory T cells limit angiotensin II-induced aneurysm formation and rupture in mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 33, 2374-2379.
30. Sasaki, N., Yamashita, T., Takeda, M., y Hirata, K. (2012). Regulatory T cells in atherogenesis. *J.Atheroscler.Thromb.*, 19, 503-515.
31. Ait-Oufella H., Sage A. P., Mallat Z., Tedgui A. (2014) Adaptive (T and B Cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circulation Research.* 114(10):1640–1660.
32. Pastrana, J. L., Sha, X., Virtue, A., Mai, J., Cueto, R., Lee, I. A. y col. (2012). Regulatory T cells and Atherosclerosis. *J.Clin.Exp.Cardiol.*, 2012, 2.
33. Tedgui, A. y Mallat, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.*, 86, 515-581.

34. Lopez-Pedrerera, C., Aguirre, M. A., Barbarroja, N., y Cuadrado, M. J. (2010). Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches. *J.Biomed.Biotechnol.*,
35. Roman, M. J., Shanker, B. A., Davis, A., Lockshin, M. D., Sammaritano, L., Simantov, R. y col. (2003). Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N.Engl.J.Med.*, 349, 2399-2406.
36. McMahon, M., Hahn, B. H., y Skaggs, B. J. (2011). Systemic lupus erythematosus and cardiovascular disease: prediction and potential for therapeutic intervention. *Expert.Rev.Clin.Immunol.*, 7, 227-241.
37. Kao AH, Lertratanakul A, Elliott JR, Sattar A, Santelices L, Shaw P, Birru M, Avram Z, Thompson T, Sutton-Tyrrell K, Ramsey-Goldman R, Manzi S. (2013) Relation of carotid intima-media thickness and plaque with incident cardiovascular events in women with systemic lupus erythematosus. *Am J Cardiol.*112:1025–1032.
38. Zhu, M., Mo, H., Li, D., Luo, X., & Zhang, L. (2013). Th17/Treg imbalance induced by increased incidence of atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin.Rheumatol.*, 32, 1045-1052.
39. Foks, A. C., Lichtman, A. H., & Kuiper, J. (2015). Treating atherosclerosis with regulatory T cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 35, 280-287.
40. Pan X, Yuan X, Zheng Y, Wang W, Shan J, Lin F, et Al. (2012) Increased CD45RA+ FoxP3(low) regulatory T cells with impaired suppressive function in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2012;7:e34662.
41. Harry Björkbacka. (2014) Can Circulating Regulatory T Cells Predict Cardiovascular Disease? *EBioMedicine* , Volume 11 , 15 – 16