



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación de linfocitos T reguladores CD4+CD25+FOXP3+ (LTreg), producción de IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en adultos con esclerosis sistémica.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

JOSÉ CARLOS DE LA CRUZ CRUZ

ASESORA:

M. en C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

CO-ASESORAS:

Dra. LETICIA MANUEL APOLINAR

M. en C. ROSA ANGÉLICA CARRANZA MULEIRO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación de linfocitos T reguladores CD4+CD25+FOXP3+(LTreg), producción de IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) en adultos con esclerosis sistémica.

Que presenta el pasante: **José Carlos De la Cruz Cruz**

Con número de cuenta: 307088206 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Mayo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
VOCAL	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
SECRETARIO	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, por haberme dado la vida y no conforme con ello, se esforzaron por darme lo mejor incluyendo una buena educación y un amor incondicional. Gracias por todos los sacrificios que han hecho por ayudarme, que no han sido pocos; no me alcanzara la vida para agradecerles, los amo con todo mi ser.

A mis hermanas, Ana y Edith, porque son mi sangre y daría la vida por ellas. Las quiero y Ana espero que me superes por mucho.

Al resto de mi familia, porque cada uno de ustedes forma parte importante de este logro. Gracias familia.

A la M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez por haberme dado la oportunidad de trabajar con ella, brindarme su apoyo incondicional, un trato agradable y especialmente por haber confiado en mí como persona y profesionalista, muchas gracias, fue un placer tenerla como profesora y asesora.

A la Dra. Muleiro y a la Dra. Leticia Manuel Apolinar por darme la oportunidad y confianza de participar en este proyecto. Y de quienes no sólo recibí conocimientos, sino también su amistad, muchas gracias, son un gran ejemplo a seguir como profesionalistas, pero sobre todo como personas, tuve mucha suerte en conocerlas.

A los miembros del laboratorio de inmunología y mucosas de la ESM del IPN; gracias por su amistad, por hacer posible este trabajo y por hacerme sentir parte de ustedes.

A la Universidad Nacional Autónoma de México a la que tuve el orgullo de pertenecer desde el CCH-N, una etapa en la que madure como persona y en la que conocí a mis mejores amigos, en especial a la calabaza, gracias por tantos años de amistad.

A la FES Cuautitlán por todos los profesores y a mis compañeros que contribuyeron en mi formación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1, ENFERMEDADES AUTOINMUNES	3
1.1 Generalidades	4
1.2 Factores de riesgo causas y clasificación	4
CAPÍTULO 2, ESCLEROSIS SISTÉMICA	6
2.1 Generalidades	7
2.2 Clasificación	7
2.3 Epidemiología	8
2.4 Detección	8
CAPÍTULO 3, FISIOPATOLOGÍA	11
3.1 Generalidades	12
3.2 Lesión vascular	12
3.3 Inflamación y respuesta inmunitaria	13
3.4 Respuesta inmune celular	13
3.5 Autoanticuerpos	14
3.6 Fibrosis	14
CAPÍTULO 4, LINFOCITOS T REGULADORES Y TGF-β1 EN LA ESCLEROSIS SISTÉMICA	16
4.1 Papel de los linfocitos T reguladores en la Esclerosis sistémica	17
4.2 Papel de la IL-10 en la esclerosis sistémica	18
4.3 Papel del TGF- β en la esclerosis sistémica	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
JUSTIFICACIÓN	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22

	Página
CAPÍTULO 5, METODOLOGÍA	23
5.1 Población de estudio	24
5.2 Tipo de estudio	24
5.3 Obtención de muestras para citometría de flujo	24
5.4 Citometría de flujo	24
5.5 Obtención de suero y plasma para ELISA	25
5.6 ELISA	26
5.7 Análisis estadístico	27
CAPÍTULO 6, RESULTADOS	28
6.1 Características de la población de estudio	29
6.2 Linfocitos T reguladores en sangre periférica de pacientes con esclerosis sistémica	30
6.3 Determinaciones de TGF- β por ELISA en adultos con esclerosis sistémica	34
CAPÍTULO 7, ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXO	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características de los pacientes con Esclerosis Sistémica	30
Cuadro 2. Análisis cuantitativo del número de células CD4 ⁺ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , así como IL-10	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Paciente con dedos gangrenados consecuencia del fenómeno de Raynaud	9
Figura 2. Paciente con Esclerosis sistémica difusa	9
Figura 3. Paciente con piel dura y calcinosis	10
Figura 4. Paciente con fenómeno de Raynaud	10
Figura 5. Principales eventos involucrados en la fisiopatología de la ES	15
Figura 6. Regulación epigenética de FOXP3	18
Figura 7. Papel central del TGF-β1 en la señalización mediante la inducción de la expresión génica profibrótica	20
Figura 8. Gráficos que muestran la evolución de la enfermedad por subtipos en pacientes con ES	31
Figura 9. Dotplot e histogramas representativos de las tinciones de superficie e intracelular del fenotipo de linfocitos T reguladores por citometría de flujo	32
Figura 10. Gráficos que muestran las proporciones de los Linfocitos: A. CD4 ⁺ , B. LTreg y C. IL-10 intracelular	33
Figura 11. Gráficos que muestran los niveles séricos de TGF-β1 en adultos con esclerosis sistémica	35

ABREVIATURAS

Esclerosis sistémica (ES)

Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1)

Linfocitos T reguladores (LTreg)

Esclerosis Sistémica Difusa (ESD)

Esclerosis Sistémica Limitada (ESL)

Molécula de citoadhesión vascular-1 (VCAM1)

Molécula de adhesión intercelular (ICAM)

Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTFG)

Matriz extracelular (MEC)

Interferón (IFN)

Factor regulador de interferón 5 (IRF5)

Transductor de señal y activador de la transcripción 4 (STAT4)

Linfocitos T cooperadores (LTh)

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

Rondan MRSS-51 (Modified Rodnan Skin Score 51)

RESUMEN

La esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad tripartita en la que se asocian defectos de autoinmunidad humoral y celular, fibrosis y cambios vasculares específicos. Estos tres eventos patológicos pueden ocurrir y progresar en forma independiente. Las dos variedades más conocidas: Difusa (ESD) y limitada (ESL), presentan características propias de cada tipo. Su etiología aún es desconocida y tiene un origen multifactorial en la que pueden intervenir factores genéticos, ambientales e infecciosos.¹

Los linfocitos T tienen un papel relevante en todas las enfermedades autoinmunes para lo cual es indispensable conocer la diferenciación de las células T en los patrones Th1, Th2, Th17 o Treg según su patrón de producción de citocinas intracelulares y su participación en la regulación de las respuestas inmunes especialmente en las enfermedades autoinmunes como la ES.² En el presente trabajo se hicieron mediciones de algunas citocinas: TGF- β (por ELISA) e IL 10 (por citometría de flujo) y la evaluación de LTreg en sangre periférica, con su posible asociación clínica en pacientes adultos con ES. Además actualmente las evidencias sugieren que no existe consenso aún sobre el papel de los LTreg en la fisiopatogenia de la ES, por ello, es de gran importancia explorar las posibles relaciones causales de las respuestas reguladoras con la enfermedad.

En el estudio se incluyeron 29 pacientes con diagnóstico de Esclerosis sistémica, para las variables cualitativas se utilizó la prueba de X^2 , los niveles de LTreg, fueron contados como porcentajes del total de CD4+CD25+FOXP3+, y la concentración de TGF- β en ng/mL. Los datos son expresados como el porcentaje de cada área de análisis, se empleó la prueba de Kruskal Wallis para determinar si los datos eran paramétricos o no paramétricos, posteriormente se empleó la prueba de Anova de una vía para comparar las medias \pm DE del número de Linfocitos T reguladores en sangre periférica de pacientes con ES y los resultados de Citometría de flujo de los grupos con Esclerosis sistémica. Los resultados fueron presentados como las medianas [25–75 percentiles]. Y estos fueron considerados significantes con un valor de $p < 0.05$.

Posteriormente los resultados fueron comparados mediante, gráficas y tablas; marcando las variables que se consideraron las más importantes y significativas. Los datos más relevantes del estudio se relacionan, primero respecto a la evolución de la

enfermedad 12 ± 8 años para la ESD y 16 ± 12 años para la ESL, donde comparando con trabajos realizados anteriormente, se hace notar que los perfiles de citocinas se ven modificados por la duración de la enfermedad, y sugiere alteraciones del balance inmunológico durante el curso de la misma. En cuanto a los niveles de linfocitos T reguladores, nuestro estudio mostró una disminución significativa de estos en comparación con individuos sanos, teniendo para estos 2.2% para la ESD y ESL, 0.4% y 0.25 % respectivamente así como niveles significativamente menores de TGF- β 1 e IL-10 respecto a un grupo control. Dichas discrepancias pudieran ser explicadas por el tiempo de evolución o duración de la enfermedad de los sujetos estudiados, siendo mayor el tiempo de evolución en nuestro estudio en comparación con los estudios realizados. Los datos presentados sugieren alteraciones en las funciones efectoras de los linfocitos Treg en adultos con ES sin importar el subtipo clínico de la enfermedad, además correlacionan con baja IL-10 intracelular y concentraciones disminuidas de TGF- β 1 a nivel periférico. Esta disminución en la expansión de linfocitos CD4+CD25+FoxP3+ reguladores y su producción de IL-10 puede ser debida por un lado a la evolución clínica tardía > de 5 años que tienen los pacientes; así como contrario a lo esperado encontramos niveles de TGF- β en pacientes con ES menores o similares al grupo control. Además TGF- β 1 a su vez interfiere con sus vías de señalización teniendo posibles efectos supresores de la respuesta inmunológica en la activación de alguno de sus componentes como lo son los LTreg.

CAPÍTULO

1

“ENFERMEDADES AUTOINMUNES

1.1 GENERALIDADES

Una de las principales funciones del sistema inmunológico (SI) es la de protección contra patógenos, pero esta no es la única función ya que un importante objetivo del SI es la inmunovigilancia. Lo que implica no sólo la protección contra patógenos, sino además la protección contra agentes propios cuando estos son alterados por el envejecimiento o transformados por procesos neoplásicos. Lo anterior implica la existencia de un complejo mecanismo que presenta y reconoce antígenos, así como un estricto sistema de control y regulación que permita diferenciar a lo “propio y sano” y al mismo tiempo reconocer y atacar a lo “extraño” a lo que se conoce como tolerancia inmune.³

La tolerancia contra componentes propios del organismo actúa eliminando o inactivando funcionalmente las poblaciones de linfocitos autorreactivos. De esta forma, cuando un elemento es reconocido como propio se desarrolla un mecanismo activo de no respuesta, denominado tolerancia inmune. En cambio, sí un elemento es reconocido como extraño, se activa la respuesta inmune encaminada a destruir dicho antígeno. Cuando estos mecanismos fallan aparecen en el organismo las enfermedades autoinmunes.⁴

1.2 FACTORES DE RIESGO CAUSAS Y CLASIFICACIÓN

Las causas de la ruptura del equilibrio no han sido aclaradas en su totalidad, sin embargo, se conocen factores que participan en el desarrollo de la autoinmunidad. Algunos de estos son:

- Genéticos; la presencia de ciertos alelos del complejo principal de histocompatibilidad, principalmente del locus HLA-DR predisponen al desarrollo de enfermedades autoinmunes.⁵
- Hormonales; se ha descrito que enfermedades autoinmunes ocurren principalmente en mujeres teniendo inicio, sobre todo, en años en que la producción de estrógenos es máxima .⁵
- Edad; los estudios asocian que con el paso de los años, aumenta la predisposición a enfermedades autoinmunes debido a la disminución en la actividad de LTreg.⁶

- Deficiencia de inmunoglobulina A; permitiendo el contacto de tejidos con ciertos antígenos que podrían inducir una respuesta contra antígenos propios.⁷

- Infecciones virales, bacterianas, fúngicas, etc. que producen alteración o colonización de la membrana celular; así como alteraciones del timo, médula ósea y otros tejidos que participan en el desarrollo y la activación de la respuesta inmune.^{5 8}

- Factores ambientales y sustancias químicas que en condiciones particulares desencadenan reacciones autoinmunes entre los que se incluyen hidrocarburos, pesticidas, fármacos, tinturas, suplementos dietarios, radiación ultravioleta, metales pesados y en concreto para la ES la exposición al polvo de sílice .⁵

Dentro de las enfermedades autoinmunes se tienen “enfermedades específicas de órganos” con autoanticuerpos órgano específicos, o se encuentran diferentes trastornos en los que las lesiones tienden a estar localizadas a un solo órgano, pero los anticuerpos no son órgano específicos. Y por último están las “enfermedades autoinmunitarias no orgánicas o sistémicas” que pertenecen a la clase de los trastornos reumatológicos como es el caso de la ES en el que tanto las lesiones como los autoanticuerpos no comprometen un solo órgano.⁶

CAPÍTULO

2

“ESCLEROSIS SISTÉMICA”

2.1 GENERALIDADES

La ES es una enfermedad autoinmune, crónica y multifactorial que es caracterizada por 3 principales eventos: daño microvascular, alteraciones de la inmunidad innata y adaptativa, y fibrosis generalizada en múltiples órganos, esta última característica es el sello distintivo de esta enfermedad. Se manifiesta por engrosamiento y fibrosis de la piel; fenómeno de Raynaud, manifestaciones musculoesqueléticas; como se mencionó anteriormente compromiso de órganos internos, entre los que se incluyen la vía gastrointestinal, corazón, pulmón y riñón; así como la presencia de autoanticuerpos específicos. En general, el grado de afectación de la piel y su tasa de progresión reflejan la gravedad de las complicaciones de órganos viscerales.⁹

Una característica de la ES es la variabilidad de paciente a paciente y la heterogeneidad que se ha observado en las manifestaciones clínicas, en los perfiles de autoanticuerpos, en el tiempo de progresión de la enfermedad, la respuesta al tratamiento y la supervivencia.⁹

2.2 CLASIFICACIÓN

Las formas clínicas de presentación se dividen en tres grupos:

1. Esclerodermia localizada: morfea en placas y morfea lineal.¹⁰
2. Esclerosis sistémica con sus variantes: esclerosis sistémica limitada, esclerosis sistémica difusa y
3. Formas de esclerosis sistémica sine scleroderma.¹⁰

Para el fin de este trabajo se revisará de forma más exhaustiva el segundo grupo en el que tomando como base los hallazgos clínicos y de laboratorio se distinguen dos tipos principales de pacientes: los que presentan una afectación cutánea difusa y los que presentan una afectación cutánea limitada

Afectación cutánea difusa. Es rápidamente progresiva en el plazo de meses, con afectación siempre proximal a los codos (brazos, tórax y abdomen), aunque puede iniciarse en zonas distales de las extremidades (acroesclerosis).¹⁰

Afectación cutánea limitada. La lesión cutánea se mantiene estable o es lentamente progresiva, manifestándose en manos, antebrazos, pies y cara; el daño orgánico es muy tardío. Dentro de este grupo se encuentran las variantes denominadas síndrome

de CREST (Calcinosis, fenómeno de Raynaud, afectación esofágica, esclerodactilia y telangiectasias).¹⁰

2.3 EPIDEMIOLOGIA

La prevalencia e incidencia estimada de la ES alrededor del mundo es heterogénea debido a variaciones geográficas, étnicas, factores ambientales y factores genéticos. Se han observado bajas estimaciones de prevalencia (<150 por millón) e incidencia (<10 por millón por año) en el norte de Europa y Japón, mientras que se han reportado altas estimaciones de prevalencia (276-443 por millón) e incidencia (14-21 por millón por año) en el sureste de Europa, Norteamérica y Australia, en México no se conoce una prevalencia con certeza.¹¹ El criterio de clasificación del 2013 de ACR–EULAR (Colegio Americano de Reumatología y la Liga Europea contra las enfermedades reumáticas) es más sensible que el criterio publicado en la década de los 80's porque este incluye pacientes que son positivos para anticuerpos específicos de centrómero y que han limitado la participación cutánea. Como consecuencia, la prevalencia estimada de la esclerosis sistémica basada en los criterios de clasificación de ACR-EULAR fue mucho más alta que estimaciones previas estimadas. El desarrollo de la esclerosis sistémica depende del sexo, como es el caso de todas las enfermedades del tejido conectivo, es mucho más común en las mujeres. La frecuencia por sexo presento una relación mujer hombre de 4:1. La edad de presentación más frecuente fue de los 30 a 50 años.^{12 13}

2.4 DETECCIÓN

Como en otras enfermedades reumáticas, el diagnóstico precoz de la afectación de órganos permite la intervención terapéutica oportuna para prevenir el daño irreversible y mejorar el pronóstico.

Las escalas para medir la afectación cutánea: Ronda MRSS-51 (Modified Rodnan Skin Score 51). Evalúa 17 áreas corporales en una gradación del 0 al 3, donde 0 es una piel normal y 3 el máximo grosor. La importancia de la puntuación obtenida consiste en el valor predictivo para la supervivencia, la cual es más corta para los pacientes con puntuación alta al inicio del diagnóstico. Una puntuación mayor de 20

puntos en el MRSS-51 predice un riesgo mayor de crisis renales, afección cardíaca, disminución de la apertura oral y de la funcionalidad.¹

Recientemente, se han propuesto criterios preliminares para establecer el diagnóstico temprano de la ES entre los que se incluyen: Fenómeno de Raynaud, dedos tumefactos con tendencia a esclerodactilia, capilaroscopia anormal con patrón de esclerodermia, anticuerpos anticentrómero y anti-topoisomerasa.¹⁴



Figura 1. Paciente con dedos gangrenados consecuencia *del* fenómeno de Raynaud



Figura 2. Paciente con Esclerosis sistémica difusa



Figura 3. Paciente con piel dura y calcinosis



Figura 4. Paciente con fenómeno de Raynaud

CAPÍTULO

3

“FISIOPATOLOGÍA”

3.1 GENERALIDADES

Las células implicadas en el proceso de la enfermedad incluyen células endoteliales, plaquetas, células estructurales (pericitos, células vasculares musculares lisas, fibroblastos y miofibroblastos) y células del sistema inmune (células T, células B, monocitos, macrófagos y células dendríticas). La activación de células se da por mediadores que incluyen el factor de crecimiento transformante- β (TGF β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), IL-6 e IL-13, endotelina 1, angiotensina II, mediadores lipídicos y autoanticuerpos, junto con especies reactivas de oxígeno (ROS) y numerosas otras sustancias biológicamente activas. Sin embargo aún es en la ES poco conocida la base patogénica para el predominio del sexo femenino, la heterogeneidad de la enfermedad y los resultados variables, la naturaleza de los desencadenantes ambientales y su interacción con susceptibilidad genética así como la contribución de estas interacciones a la susceptibilidad de la enfermedad y el fenotipo.⁹

3.2 LESION VASCULAR

La lesión vascular y la activación celular del endotelio lo que resulta en daño vascular son posiblemente los mecanismos primarios en la ES.¹ El daño vascular progresivo causa una reducción en el número de capilares. El engrosamiento de la pared de los vasos y estrechamiento luminal, que conducen a la hipoxia tisular y estrés oxidativo. Adicionalmente, las células endoteliales activadas muestran un aumento de la expresión de la molécula de citoadhesión vascular-1 (VCAM1), molécula de adhesión intercelular (ICAM) y E-selectina, resultando en el reclutamiento de células inflamatorias. También se secreta endotelina-1, factor de crecimiento de tejido conectivo (CTFG) y otros factores profibróticos que estimula la proliferación de las células del músculo liso vasculares y producción de matriz extracelular. La infiltración de las células inflamatorias en las lesiones pueden ser prominentes en pacientes en los primeros estados de la enfermedad y las células inflamatorias e inmunes son una fuente importante de TGF β , PDGF, IL-1, IL-6 y otros mediadores profibróticos.

3.3 INFLAMACIÓN Y RESPUESTA INMUNITARIA

La desregulación de la inmunidad innata y adaptativa juega un papel importante en la ES. La evidencia de la autoinmunidad incluye la presencia de células y moléculas inflamatorias en los tejidos diana tales como la piel y los pulmones; las alteraciones en el número y función de células inmunológicas circulantes: la presencia prominente de Interferón (IFN), la infiltración de células inmunes en tejidos; y distintos autoanticuerpos plasmáticos en la mayoría de los pacientes.⁹ Además, algunos estudios genéticos identificaron que los polimorfismos de IRF5 (factor regulador de interferón 5) y STAT4 (transductor de señal y activador de la transcripción 4), junto con varios otros genes de rutas inmunológicas, se asocian a la ES .⁹

3.4 RESPUESTA INMUNE CELULAR

Diversos procesos patológicos de base inmunológica se han descrito que se deben a la desregulación de los linfocitos T cooperadores (LTh). Así el exceso de las señales que generan los Th1 se asocian al proceso inflamatorio, mientras que el aumento del estímulo de producción que generan los Th2 desencadenan enfermedades atópicas, fundamentalmente alergias y asma.¹⁵

Un mecanismo asociado se relacionaron las células Th17, aunque se han descubierto recientemente, su hiperfunción ya se ha asociado a procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes promovidos, fundamentalmente, por el efecto proinflamatorio de la IL-17.¹⁵

Entre los linfocitos T CD⁴⁺, los Th2 caracterizados por la secreción de IL-4 e IL-13, predominan sobre los Th1, que secretan principalmente IFN γ anti fibrótico. El papel de las células Th17 todavía no se define; en algunos estudios implican a IL-17 en la fibrosis y otros estudios indican un efecto anti-fibrótico.¹⁶

Otro subtipo de linfocito T importante en el desarrollo de la ES son los LTreg pero estos se abordarán más a fondo en el siguiente capítulo.

3.5 AUTOANTICUERPOS

Casi todos los pacientes con ES tienen autoanticuerpos circulantes altamente específicos. Por lo general, estos anticuerpos son contra los componentes nucleares

y nucleolares intracelulares, pero también pueden dirigirse hacia receptores de superficie celular y antígenos extracelulares, incluyendo la fibrilina 1, metaloproteinasa de matriz 1 (MMP1), MMP3, para receptores de superficie celular de acetilcolina (el receptor de acetilcolina muscarínico M3), PDGF, endotelina 1 y angiotensina II. Aunque la importancia diagnóstica de anticuerpos nucleares y nucleolares específicos en la ES es reconocida, su contribución potencial a la patogénesis y el daño tisular se desconoce.⁹

3.6 FIBROSIS

El sello distintivo de la esclerosis sistémica, es la progresiva acumulación tisular de matriz fibrosa compuesta de colágeno, elastina, glicosaminoglicanos y fibronectina y la sustitución de la arquitectura normal del tejido, con compactación, tensión mecánica y tejido conectivo rígido.

El tejido tisular es caracterizado por la presencia de músculo actina- α -positivo liso y miofibroblastos resistentes a la apoptosis.⁹ Estas células contráctiles no sólo secretan moléculas de la matriz, sino también TGF- β que se abordará más afondo en capítulos posteriores y otros mediadores profibróticos que promueven una mayor acumulación de matriz extracelular y remodelación. La fibrosis es la culminación de la interacción de los eventos inmunológicos, vasculares y fibrogénicos que caracterizan a la ES. Existen diversas citocinas implicadas en este proceso, TGF- β , PDGF, IL-4, IL-6 e IL-8, las cuales a través de receptores de superficie celular estimulan la producción de colágeno tipos I, III, IV, V y VI.⁵ Las biopsias cutáneas de pacientes con la forma temprana de la enfermedad pueden revelar infiltrado inflamatorio de linfocitos T y monocitos. Con el tiempo, la piel se vuelve atrófica, con adelgazamiento de la epidermis, disminución de los capilares dérmicos con la consiguiente hipoxia y aumento de la síntesis del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y otros factores angiogénicos.¹

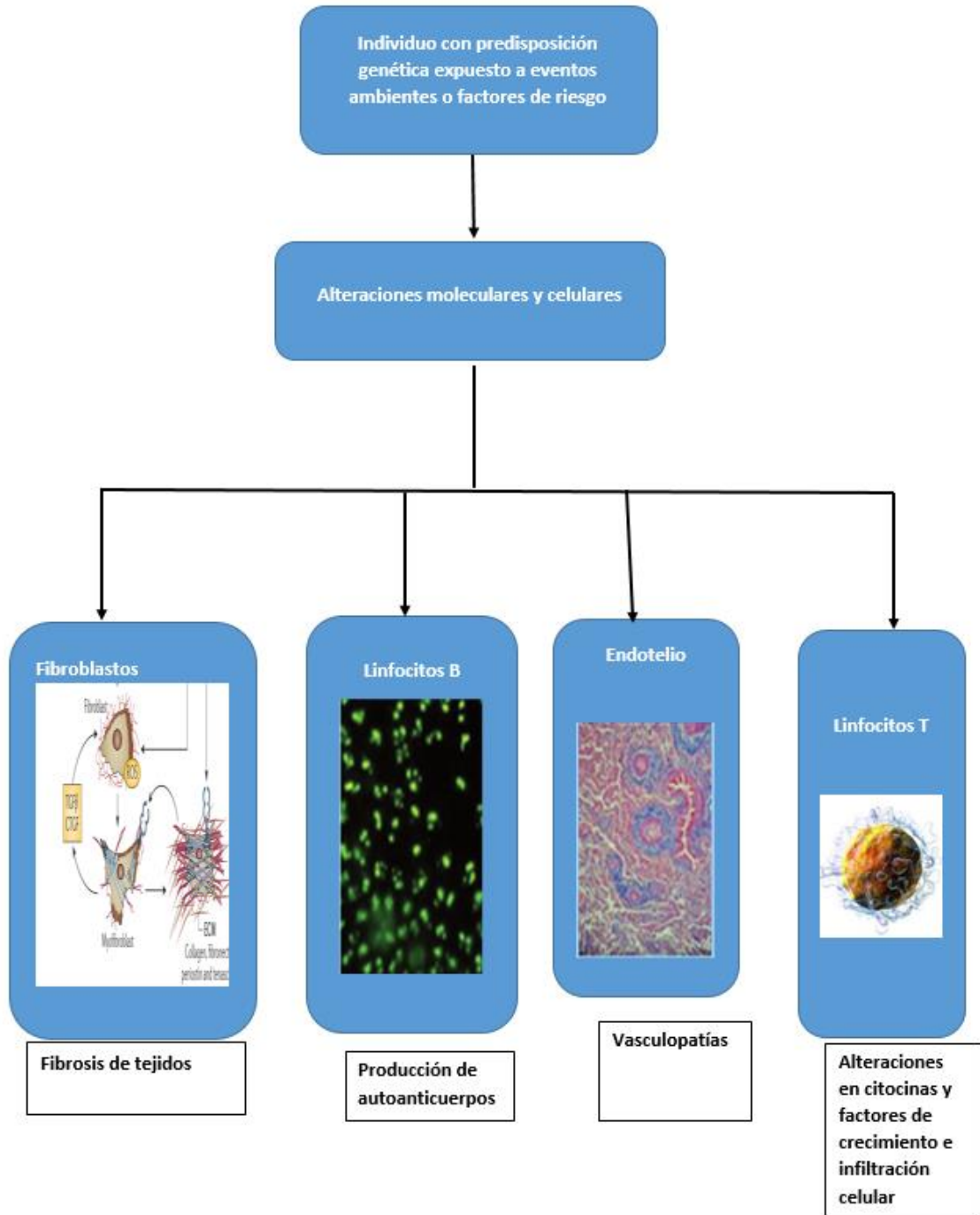


Figura 5. Principales eventos involucrados en la fisiopatología de la ES

CAPÍTULO
4
“LINFOCITOS T
REGULADORES Y
TGF-BETA1
EN LA ESCLEROSIS
SISTÉMICA

4.1 PAPEL DE LOS LINFOCITOS T REGULADORES EN LA ESCLEROSIS SISTEMICA

Los LTreg juegan un papel importante en la autotolerancia como un regulador de las respuestas inmunitarias. Han sido reportados en pacientes con una variedad de enfermedades autoinmunes y desórdenes alérgicos, proporciones bajas de LTreg y/o supresión defectuosa de estos. En la ES la función de los LTreg puede ser de particular interés ya que tienen una participación estrecha con TGF- β en la fisiopatogénia y en la respuesta inmune, además TGF- β es vital para su desarrollo, la supervivencia y la actividad. Algunos estudios han demostrado incrementos, no disminución, de los porcentajes de células CD4+CD25+ en sangre periférica de pacientes con ES.¹⁷

Los LTreg representan hasta el 10% del subconjunto de células T CD4 + en la sangre periférica, con la responsabilidad de la regulación de los linfocitos T autorreactivos. El agotamiento de los LTreg conduce al desarrollo de enfermedad autoinmune multisistémica en modelos animales. La disminución de la proporción o alteraciones en la actividad funcional de los LTreg se han reportado en asociación con varias enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas en humanos.^{18 19 20}

Además, algunos estudios, muestran asociación del aumento de LTreg con la actividad y gravedad de ES, lo que sugiere el potencial papel de los LTreg en la patogénesis de esta enfermedad.¹⁹ Por otro lado, el aumento de LTreg en la ES puede estar asociado con una mayor frecuencia de células productoras de IL-2, constituyendo un mecanismo de retroalimentación que controla la expansión de células T durante la respuesta inmune. Sin embargo, la otra cara de la moneda es la disminución de los LTreg en la ES, puesto que la metilación del ADN de secuencias reguladoras en estos linfocitos afecta al factor de transcripción requerido (FOXP3) para la generación de linfocitos T reguladores alterando su proporción en pacientes con ES.²⁰

Las citocinas producidas por estas células, predominantemente son IL-10 y TGF- β , los principales reguladores de la homeostasis durante la respuesta inflamatoria, donde IL-10 es conocida como factor inhibidor de la síntesis de citocinas, ya es uno de los más potentes agentes inmunosupresores.²¹

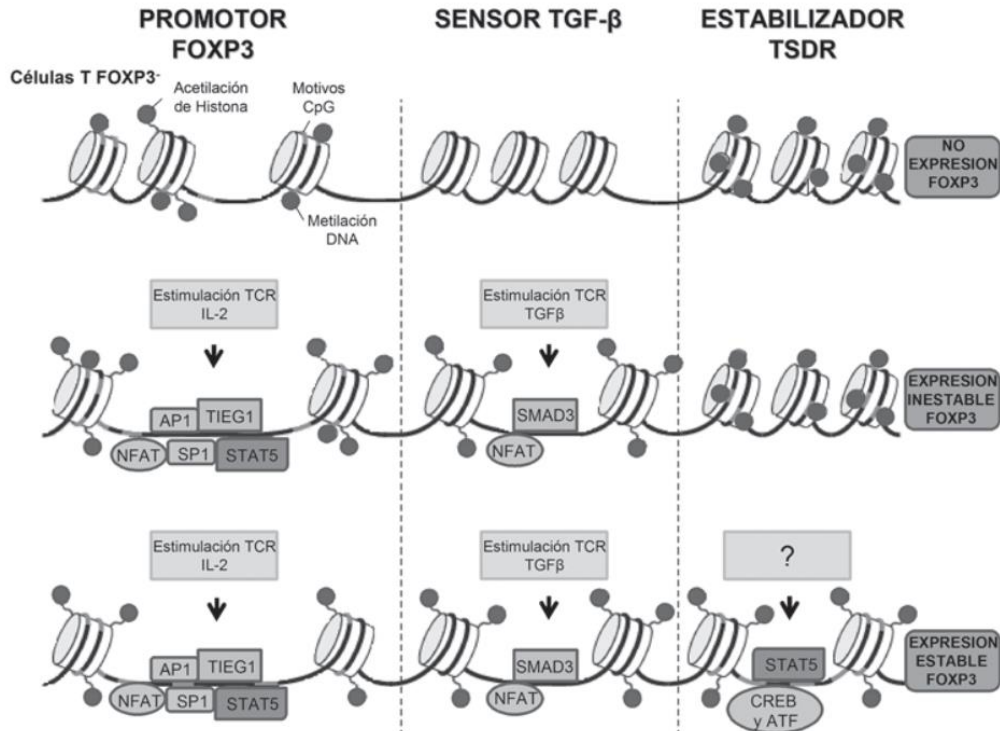


Figura 6. Regulación epigenética de FOXP3 tomada de González JL. 2010

4.2 PAPEL DE LA IL-10 EN LA ESCLEROSIS SISTÉMICA

Los LTreg son productores de IL-10, y hay alguna evidencia de que los LTreg no logran desarrollar su función en ausencia de IL-10.²² Además, la IL-10 puede inducir la diferenciación y activar la función de supresión del subconjunto regulador.

Por otra parte, la IL-10 ha sido descrita como un factor de crecimiento para células B activadas, por lo tanto un aumento de la producción de esta citocina puede jugar un papel importante en la aparición de manifestaciones clínicas de las enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos, esto llama la atención como un regulador inmune importante en el proceso de la inflamación y como un jugador participante crucial en el control de la auto-tolerancia y la autoinmunidad.²²

4.3 PAPEL DE TGF- β EN LA ESCLEROSIS SISTÉMICA

El TGF- β es una citocina pleiotrópica. Se considera como la citocina implicada en los procesos fisiológicos como el control de cicatrización de heridas, reparación del tejido, integridad epitelial, respuestas inmunes y adaptativas así como en procesos patológicos en la fibrogénesis. Se caracteriza por ser quimiotáctico para fibroblastos, estimula su proliferación y su diferenciación en miofibroblastos, los cuales, a su vez, son la mayor fuente de TGF- β durante el proceso fibrótico, activándose de forma autocrina y paracrina induciendo la activación de otros fibroblastos. TGF- β también incrementa la síntesis de proteínas de la matriz extracelular mediante el aumento de la producción de colágeno tipo I, III, V y VI, al igual que de proteínas tales como fibronectina y alfa-SMA (marcador molecular de miofibroblastos activados); disminuye además la síntesis de metaloproteinasas que degradan colágeno.²³

La regulación alterada de TGF- β está asociada con condiciones como la ES. La dualidad de TGF- β se demostró en un modelo de autoinmunidad en ratones propensos al lupus. Donde se encontró que el TGF- β era necesario para mantener la tolerancia inmune, mientras promueve la fibrosis del tejido.²⁴

La excesiva actividad de TGF- β es una característica común de varias condiciones fibróticas de diversas etiologías. El enlace entre la señalización aberrante de TGF- β está relacionado con la aparición de una fibrosis patológica en la ES. En ratones con mutaciones en la vía TGF- β se ha observado que desarrollan progresiva fibrosis en múltiples órganos.²⁵

Pacientes con ES difusa cutánea muestran un “gen distintivo sensible a TGF-B” sobre perfiles de expresión génica de la piel lesionada. En estos pacientes se ha sugerido que tienen una enfermedad más grave (más altos puntajes del índice de Rodnan y un mayor riesgo de afectación pulmonar) que aquellos sin este patrón de expresión genico.²⁵

El TGF- β es generalmente secretado por monocitos, linfocitos y fibroblastos como una proteína precursora inactiva biológicamente. La activación de TGF- β latente es un paso regulador crítico en la señalización de TGF- β es catalizado por serina proteasas y trombospondina así como las integrinas de la superficie celular. La matriz extracelular es un importante almacén de TGF- β que secuestra la citocina en una forma

latente. La transducción de señales intracelulares se inicia a través del complejo receptor de TGF- β y activación secuencial. La vía canónica SMAD es la única asociada con la desregulación de la señalización de TGF- β en la ES.⁹

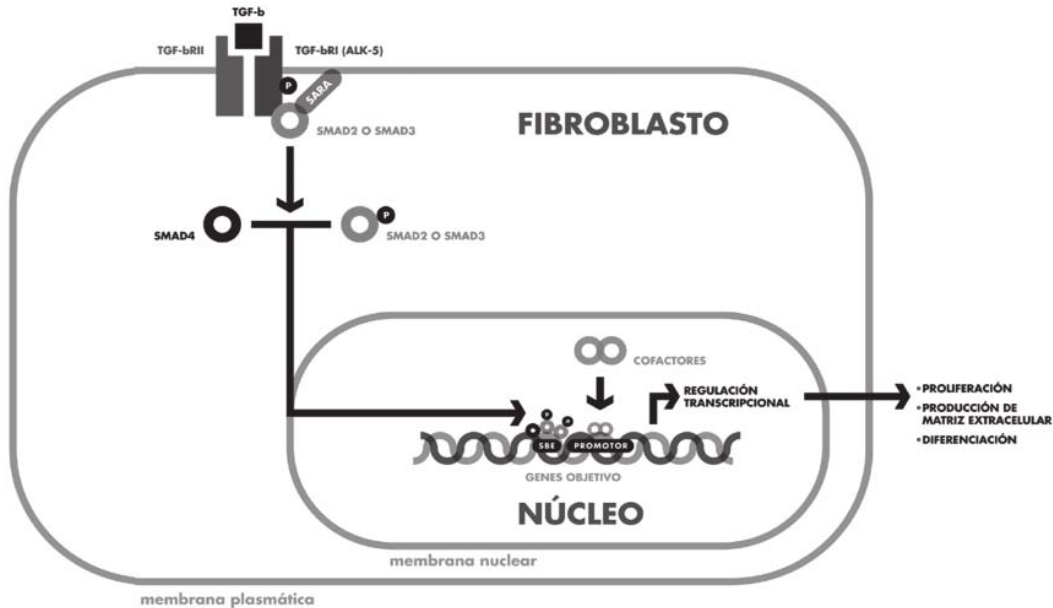


Figura 7. El TGF- β tiene un papel central en la señalización mediante la inducción de la expresión génica profibrótica a través de la activación de canónica (SMAD2–SMAD3 (SMAD2/3)- y SMAD4-dependiente, Estos complejos se traslocan al núcleo e interactúan con los sitios de unión en el DNA en las regiones promotoras de los genes blanco, favoreciendo su expresión. Tomada de Vanegas AL. 2011

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que hay pocos estudios asociados con la etiología de la ES que analizan el comportamiento de las poblaciones de los LTreg en pacientes adultos con ES y estos tienen resultados contrastantes por un lado en el estudio de 1993 Fioco muestra un aumento de LTreg respecto a un grupo control, además de que se apoya en el papel de un posible mecanismo mediado por LTreg en la progresión de la ES. O el estudio del 2010 de Slobodin que además lo correlaciona que a mayor porcentaje de LTreg mayor actividad severidad de la enfermedad, sin embargo esto no fue acompañado por una mayor concentración de TGF- β o IL-10, con similares resultados se tienen los experimentos de 2009 de Radstake, pero este además de demostrar un aumento de LTreg, se encontró que tienen una capacidad disminuida para controlar células T efectoras CD4+.

Sin embargo se tienen resultados que muestran lo contrario en 2013 Cordiali-Fei, que divide a los subtipos clínicos de la enfermedad encontró que en la esclerosis sistémica difusa se tenían niveles muy bajos de LTreg respecto a individuos sanos, y no parecen depender de la duración de la enfermedad; en la esclerosis sistémica limitada, se presentaron niveles de LTreg que son progresivamente más bajos en relación con la duración de la enfermedad. Teniendo en cuenta los estudios anteriores, actualmente las evidencias sugieren que no existe consenso aún sobre el papel de los linfocitos T reguladores en la fisiopatogénia de la esclerosis sistémica, es por lo anteriormente descrito que es importante explorar las posibles relaciones causales de las respuestas reguladoras con la esclerosis sistémica y establecer una relación con los niveles de las citocinas evaluadas (TGF- β e IL 10).

JUSTIFICACIÓN

La esclerosis sistémica es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida y origen multifactorial en la que intervienen factores genéticos, ambientales y hormonales que llevan al desarrollo de alteraciones en múltiples órganos.

La alteración en la inmunidad humoral y celular es una característica de la enfermedad y muestra la des-regulación del sistema inmune.

La detección de niveles de citocinas como TGF- β 1, IL-10 y poblaciones celulares como los LTreg asociándolos a su posible relación con las manifestaciones clínicas, así como la extensión del daño, podrían optimizar la evaluación periódica de cada paciente, alertando al personal de salud para seguir más de cerca a los pacientes con mayor riesgo, optimizando con ello costos de diagnóstico y tratamiento.

HIPÓTESIS

La proporción de linfocitos T reguladores (CD4+CD25+FoxP3+), IL-10 y TGF- β se verán aumentados en adultos con esclerosis sistémica pudiendo relacionarse con el subtipo clínico de la enfermedad

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe asociación entre el fenotipo clínico de la enfermedad con la proporción de LTreg así como la producción de las citocinas IL-10 y TGF- β 1 en adultos con esclerosis sistémica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Clasificar el subtipo clínico de esclerosis sistémica.
- Determinar la proporción del fenotipo celular LTreg (CD4+CD25+FoxP3+) así como la presencia de IL-10 intracelular en sangre periférica en adultos con esclerosis sistémica.
- Determinar los niveles séricos de TGF- β 1.
- Analizar si existe asociación entre los porcentajes de LTreg e IL-10 intracelular positivos y las concentraciones de TGF- β 1 con el subtipo clínico de la enfermedad.

CAPÍTULO
5
“METODOLOGÍA”

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente estudio fue aprobado por el Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3501 del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional La Raza, Ciudad de México. Con el No. de registro: R-2014-3501-105. En clínica de esclerodermia se invitó a participar a 29 pacientes adultos con diagnóstico previo de ES fueron informados e incluidos en el estudio. De cada paciente se tomaron de 5-6 mL de sangre periférica para cada tubo: anticoagulada para obtener plasma y células y con gel separador para obtener suero, utilizando sistema Vacutainer®

5.2 TIPO DE ESTUDIO

- A). Por el control de maniobra experimental por el investigador: OBSERVACIONAL
- B). Por la captación de la información: TRANSVERSAL.
- C). Por la medición del fenómeno en el tiempo: LONGITUDINAL
- D). Por la presencia de un grupo control: COMPARATIVO
- E). Por la dirección del análisis: TRANSVERSAL

5.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA CITOMETRIA DE FLUJO

Las células mononucleares se obtuvieron a partir de sangre anticoagulada obtenida por venopunción posteriormente se utilizó el buffer de lisis *BD FACSTM lysing solution* para la lisis de los eritrocitos.

5.4 CITOMETRIA DE FLUJO

Se tomaron 600 µL de cada sangre completa y se depositaron en un tubo para citometría de flujo, posteriormente se adicionaron 6µL del activador de citocinas, para la producción de citocinas intracelulares (BD Pharmigen).

1. Se incubaron 4 horas en cámara de CO₂ a 37°C con 5% de humedad.
2. En otro tubo de citometría de flujo se adicionaron 100 µL de sangre activada previamente.

3. Se adicionaron los anticuerpos de fenotipo.
4. Se incubaron 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
5. Se adicionaron 1.5 mL de solución de lisis a los tubos (lisis de eritrocitos) - solución a temperatura ambiente- y posteriormente se neutralizó la reacción con 1mL de SSF o PBS.
6. Se centrifugaron 5 minutos, 2500-3500 rpm a temperatura ambiente
7. Se Adicionaron 400µL de solución permeabilizadora a temperatura ambiente (Perm Wash).
8. Se lavaron con 1 mL de SSF o PBS.
9. Se centrifugaron 5 minutos a 2500-3500 rpm y se decantaron.
10. Se adicionaron anticuerpos intra-celulares.
11. Se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
12. Se lavaron con 1 mL de SSF, se centrifugo y decanto
13. Se adicionaron 500µL de p-formaldehido para fijar a las células.
14. Por último se cuantificaron en el citómetro de flujo FACS Aria y se analizaron mediante el software FACS DIVA.

5.4 OBTENCION DE SUERO Y PLASMA

De cada paciente se tomaron muestras de 5-6 mL de sangre periférica en tubos vacutainer® con anticoagulante y gel separador, se centrifugaron 7 minutos a 3500 rpm, posteriormente se hizo la separación de plasma y suero almacenando a -70 °C, hasta llevar acabo el procedimiento de ELISA.

5.5 ELISA

La cuantificación de TGF- β 1 fueron medidos en suero y plasma utilizando un kit ELISA Ready –SET-Go! (2nd generación) eBiosciencie®

1. La placa de ELISA se recubrió con 100 μ L/ en cada pozo con anticuerpo de captura en buffer de recubrimiento. Se selló la placa y se incubo durante la noche a 4 ° C.
2. Se aspiró y lavo 5 veces con > 250 μ L en cada pozo con buffer de lavado (diluido 1X) teniendo en cuenta el tiempo de lavado (1 minuto) durante cada etapa. La placa se puso sobre papel absorbente para eliminar cualquier tampón residual.
3. Se diluyó 1 parte del diluyente de ensayo concentrado 5X con 4 partes de agua desionizada. Se bloquearon los pozos colocando 200 μ L del diluyente de ensayo 1x. Incubando a temperatura ambiente durante 1 hora.
4. Se aspiró y se hizo el mismo procedimiento de lavado como en el paso 2.
5. Activación de muestras: Para activar TGF- β 1 latente a la forma inmunorreactiva en las muestras (pero no para los estándares) se acidificaron, y luego se neutralizaron .Primero se hizo una dilución 1:5 en PBS ,para 100 μ L de muestra ,se adiciono 20 μ L de HCl 1N; se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente ,luego se neutralizaron con 20 μ L de NaOH 1N .[posteriormente se calculó la concentración final de la muestra ,correcta tomando en cuenta el factor de dilución 1:4]
6. Usando el diluyente de ensayo, se diluyó el estándar como se indica en el certificado de análisis. Se añadieron 100 μ L por pozo con estándar en los pozos apropiados. Se realizaron diluciones por duplicado seriadas para hacer la curva estándar. Posteriormente se añadieron 100 μ L en cada pozo de las muestras activadas con HCl. Se selló la placa y se incubó toda la noche a 4°C.
7. Se aspiró y se hizo el mismo procedimiento de lavado como en el paso 2.
8. Posteriormente se adicionaron 100 μ L en cada pozo de anticuerpo de detección.Se selló la placa y se incub a temperatura ambiente durante 1 hora.
9. Se aspiró y se hizo el mismo procedimiento de lavado como en el paso 2.

10. Se adicionaron 100 μ L de Avidina –HRP (peroxidasa) en cada pozo este también se diluyó en diluyente de ensayo 1X. Se selló la placa y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente
11. Se aspiró y se hizo el mismo procedimiento de lavado como en el paso 2. Además en esta etapa de lavado, se adicionó el buffer de lavado durante 1 a 2 minutos antes de la aspiración. Se repitió el procedimiento para un total de 7 lavados.
12. Se agregaron 100 μ L en cada pozo de sustrato. Se incubó la placa a temperatura ambiente por 15 minutos.
13. Se adicionaron 50 μ L de solución de stop (H_2SO_4 1N) a cada pozo.
14. Finalmente se tomó la lectura de la placa a 450nm y se analizaron los datos de la curva por regresión lineal con el programa Prisma 6 para obtener las concentraciones de TGF- β .

5.7 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los niveles de LTreg, fueron contados como porcentajes del total de CD4+CD25+FOXP3+, y la concentración de TGF- β en ng/dL. Los datos son expresados como el porcentaje de cada área de análisis. El análisis estadístico fue realizado utilizando el software Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, Illinois por Windows (versión 21.0), se empleó la prueba de kruskal wallis para determinar si los datos eran paramétricos o no paramétricos posteriormente se empleó un prueba Anova para comparar medias \pm DE de los grupos con esclerosis sistémica. Los resultados fueron presentados como las medianas [25–75 percentiles]. Esta también fue usada para comparar el número de Linfocitos T reguladores en sangre periférica de pacientes con ES y los resultados de Citometría de flujo. Los resultados fueron considerados significantes con un valor de $p < 0.05$.

CAPÍTULO
6
“RESULTADOS”

6.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACION DE ESTUDIO

El estudio incluyó el análisis de 29 adultos con esclerosis sistémica, 15 de la variedad difusa, 14 con variedad limitada y 13 controles que fueron pareados por edad y sexo. Las evaluaciones basales no mostraron diferencias significativas con respecto a edad (Esd 55 ± 10 ; ESL 51 ± 13) siendo similar en ambos grupos, género se presenta en mayor prevalencia en mujeres en ambos grupos, evolución de la enfermedad y comorbilidades cuando se compararon los fenotipos clínicos de la enfermedad (Tabla 1). De las comorbilidades se mencionan diabetes 1(3%), hipertensión 5(17%), obesidad 4(14%), hipotiroidismo 4(14%), síndrome de Sjögren 8(28%), ERGE 2(7%), cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune 1(3%), artritis reumatoide y fibrosis pulmonar 1(3%).

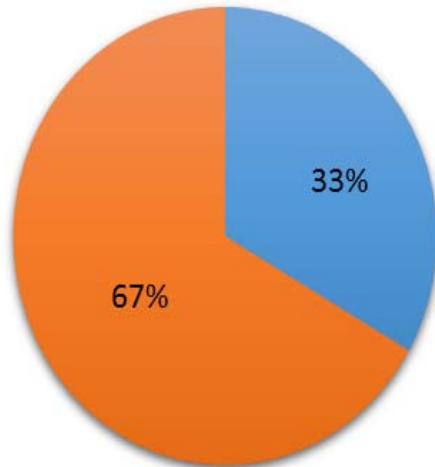
Cuadro 1. Características de los pacientes con Esclerosis Sistémica

Características epidemiológicas	ESd (ESd) n=15	ESI (ESI) n=14	P
Edad (años),media ±DE	55±10	51 ±13	0.63
Género Femenino, n (%)	14 (93)	14 (100)	0.32
Duración de la enfermedad (años), media ± DE	12±8	16±12	0.614
Comorbilidades, n (%)			
Artritis Reumatoide	0	1(7)	0.292
ERGE (Enfermedad por Reflujo Gastroesofágico)	0	2(14)	0.129
Fibrosis Pulmonar	1(7)	1(7)	0.960
DM2	2(13)	3(21)	0.564
Dermatomiositis	1(7)	0	0.326
Hipotiroidismo	2(13)	2(14)	0.941
Cirrosis Biliar Primaria	0	1(7)	0.292
Hepatitis autoinmune	0	1(7)	0.292
Síndrome de Sjögren	4(27)	4(29)	0.909
HAS	3(20)	2(14)	0.684
Obesidad	2(13)	2(14)	0.941

Nota.-Los datos fueron presentados en n (%) o media ± DE utilizando para edad, y duración de la enfermedad la prueba U Mann Whitney, para los datos cualitativos se utilizó la prueba X².

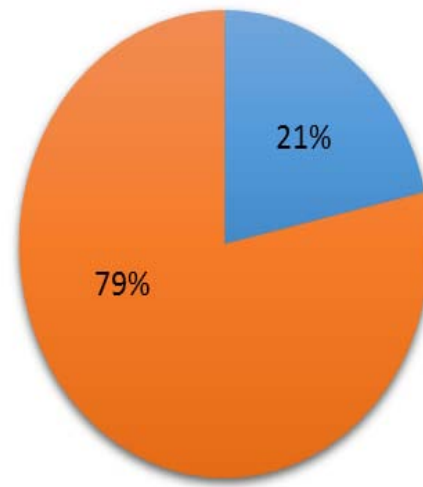
A.

DIFUSO



B.

LIMITADO



■ EVOLUCIÓN TEMPRANA ■ EVOLUCIÓN TARDIA ■ EVOLUCIÓN TEMPRANA ■ EVOLUCIÓN TARDIA

Figura 8. Gráficos que muestran la evolución de la enfermedad por subtipos en pacientes con ES

6.2 LINFOCITOS T REGULADORES EN SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON ESCLEROSIS SISTEMICA

La inmunofenotipificación de las enfermedades autoinmunes es relevante para el conocimiento de su fisiopatología; en este estudio la técnica de “Citometría de Flujo” fue empleada para la determinación de los linfocitos T reguladores y citocinas intracelulares (IL-10) en sangre total de pacientes con esclerodermia. Las proporciones de linfocitos CD4⁺, Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) y CD4⁺CD25⁺IL-10⁺ no mostró diferencias significativas cuando se comparó entre la variedad difusa y limitada (Tabla 2). Sin embargo, el grupo control mostró un aumento en el porcentaje de células reguladoras de manera estadísticamente significativas al comparar los resultados obtenidos con los pacientes con esclerosis sistémica.

Para la correcta evaluación del fenotipo Treg y las proporciones intracelulares de IL-10 por citometría de flujo se procedió con la aplicación de los siguientes filtros de selección con en el software FACS DIVA con el cual fueron evaluados; una vez

seleccionada la región linfoide, se colocó el filtro para la determinación de la proporción de CD4⁺ por dotplot, y la región doble positiva para nuestra población celular de interés CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺; un último filtro fue aplicado para la evaluación de IL-10 intracelular por dotplot e histograma (Figura 9).

Las observaciones realizadas en el fenotipo T regulador y para IL-10 en el grupo control presento una mayor proporción (60.3%), en comparación con los grupos con esclerosis sistémica difusa y esclerosis sistémica limitada, encontrando que existe una tendencia a la disminución en la variedad difusa en comparación con la limitada (Figura 10, B y C). Cuando se compararon los resultados con los sujetos sanos pudimos observar un aumento significativo de la producción de IL-10 proveniente de los linfocitos T reguladores.

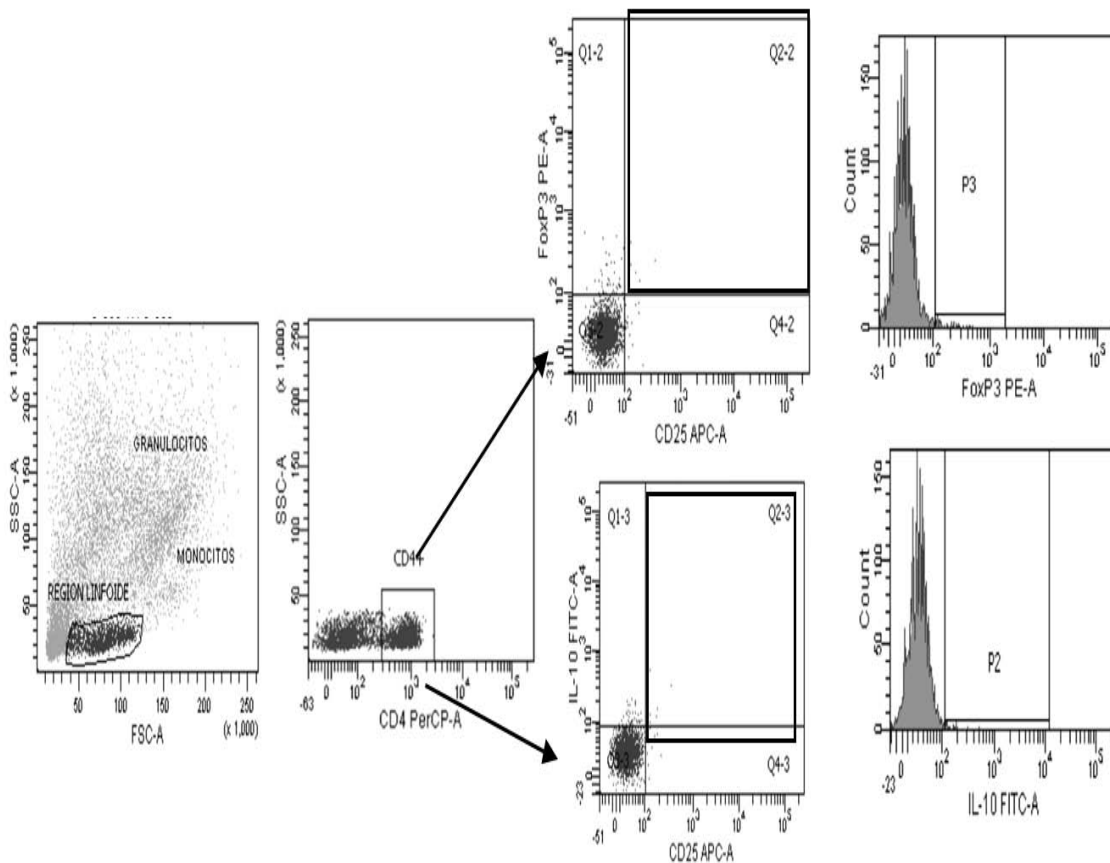


Figura 9. Dotplot e histogramas representativos de las tinciones de superficie e intracelular del fenotipo de linfocitos T reguladores por citometría de flujo en sangre de los grupos con esclerosis sistémica y controles sanos.

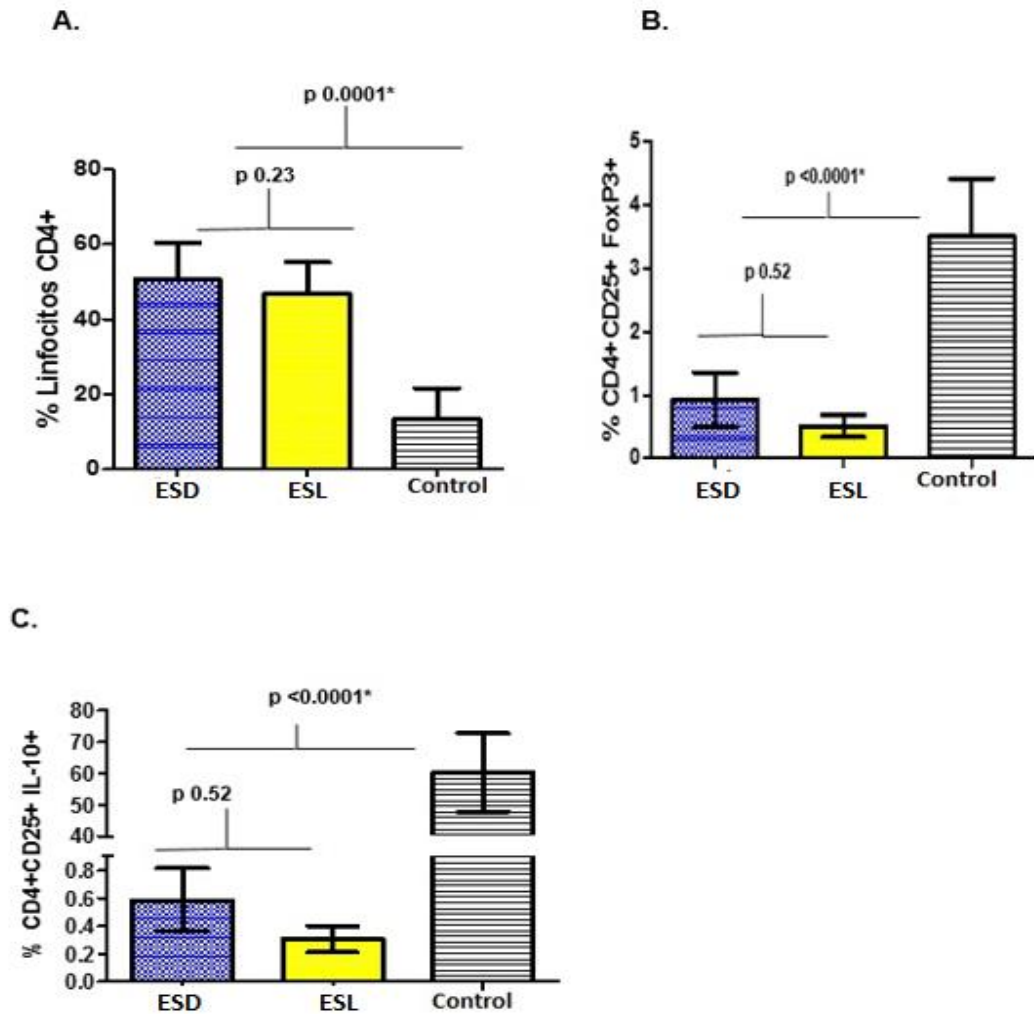


Figura 10. Gráficos que muestran las proporciones de los Linfocitos: A. CD4+, B. LTreg y C. IL-10 intracelular, en sangre de adultos con esclerosis sistémica difusa y limitada. Fue empleando una Anova de una vía para comparar las medias de los tres grupos. Los resultados fueron considerados significativos estadísticamente con un valor de $p < 0.0001$

Cuadro 2. Analisis cuantitativo del número de células CD⁴⁺, CD⁴⁺CD²⁵⁺ FoxP³⁺, así como IL-10 intracelular en sangre de adultos con esclerosis sistémica, evaluado por citometría de flujo

Inmunofenotipo de Linfocitos T reguladores (%)	ESD (n=15)	ESL (n=14)	Control (n=13)	P
CD ⁴⁺	50.6 [47.8-57.3]	46.7 [39.2-55.8]	13.89 [5.68-18]	< 0.0001*
CD ⁴⁺ /FoxP ³⁺ /CD ²⁵⁺	0.4 [0.1-1.5]	0.25 [0.07-0.72]	2.2 [1.41- 4.59]	< 0.0001*
CD ⁴⁺ /CD ²⁵⁺ / IL-10 ⁺	0.2 [0.1-0.7]	0.2 [0.0-0.52]	91.2 [4.93-98.4]	< 0.0001*

Nota.-El conteo de células positivas fue expresado en medianas [25-75 percentiles].

ESD; Esclerosis Sistémica Difusa; ESL Esclerosis Sistémica Limitada. Para comparar los grupos se utilizó la prueba ANOVA

6.3 Determinaciones de TGF-β1 por ELISA en adultos con esclerodermia

El análisis por ELISA para la cuantificación de TGF-β (Controles 2.99 ± 1.45 ng/mL, ESD 2.81 ± 2.07 ng/mL; ESL 2.90 ± 2.05 ng/mL y no clasificados 2.47 ± 2.05), sin obtener resultados significativos en la comparación de sus concentraciones séricas entre la variedad difusa y limitada (figura 11).

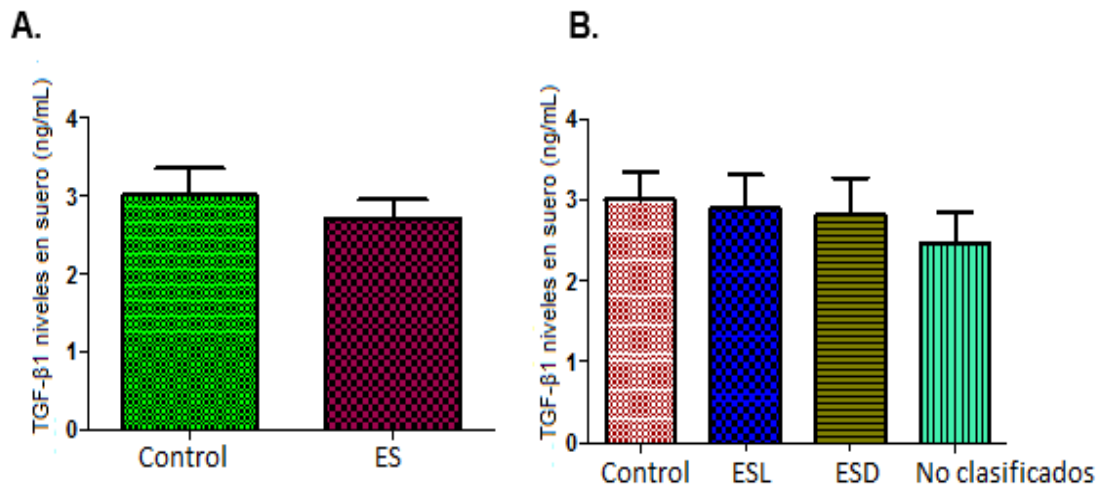


Figura 11. Gráficos que muestran los niveles séricos de TGF-β1 en adultos con esclerodermia. La prueba ANOVA fue usada para comparar la concentración TGF-β en sangre periférica de pacientes con esclerosis sistémica. Los resultados fueron obtenidos por ELISA.

CAPÍTULO

7

“ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES”

7.1 Discusión

La esclerosis sistémica es una enfermedad autoinmune crónica degenerativa caracterizada por vasculopatía, fibrosis cutánea y visceral en la que su etiología y fisiopatogenia aún no es clara. Los dos principales subtipos de ES son la limitada y difusa, difieren en su evolución y pronóstico. Como en la mayoría de las enfermedades reumáticas autoinmunes la ES afecta con mayor frecuencia a mujeres de mediana edad en nuestro estudio confirmamos dicha tendencia con una relación 14:1 similar a lo reportado; con una tendencia a aumentar la proporción de casos en relación con el aumento de la edad, posiblemente asociado a factores hormonales, uso de anticonceptivos orales, historia reproductiva entre otros.²⁶ En cuanto a la progresión de la enfermedad Foeldvari I. y cols. 2013 reportaron 11.1 (1.8-79) años de evolución; evolución tardía, similar a lo observado en nuestra cohorte de estudio. No obstante, Radstake T.R, y cols. en el 2009 evidencian tanto evolución temprana de la enfermedad (1.2 ± 0.8) años o bien evoluciones tardías por mucho superiores a las que nosotros observamos (43.8 ± 13.4 ES limitada, 38.6 ± 12.3 ES difusa). Otros investigadores observan 6.9 ± 0.3 años, una duración mucho menor que la que pudimos observar.^{27 28} Es de importancia tomar en cuenta la evolución (Figura 8) ya que existen reportes donde el aumento significativo de diversas citocinas está influenciado por la duración de la enfermedad sobre todo en la evolución temprana de 0 a 5 años o duración de 5 a 10 años, mientras que otras como en la IL-10 se han observado niveles elevados circulantes en pacientes con más de 10 años de evolución. Estos datos hacen notar que los perfiles de citocinas se ven modificados por la duración de la enfermedad, y sugiere alteraciones del balance inmunológico durante el curso de la enfermedad. Dentro de las comorbilidades asociadas con ES están la sobreposición con otros padecimientos reumáticos autoinmunes como dermatomiositis, artritis reumatoide, Síndrome de Sjögren y de manera menos frecuente hepatitis autoinmune que estuvieron presentes en nuestra cohorte de estudio (Cuadro 1). Las principales complicaciones clínicas en la ES están integradas por pulmonares como hipertensión pulmonar arterial (HPA), enfermedad pulmonar intersticial (EPI), renales como crisis renales y las gastrointestinales, en este estudio se observó con una baja frecuencia de fibrosis pulmonar y ERGE. Por excelencia las complicaciones cardiopulmonares y

renales son las que se presentan con mayor frecuencia en relación con la severidad de la enfermedad, nuestro grupo de estudio presenta en baja frecuencia dichas complicaciones probablemente debido a que a pesar de la larga evolución de los pacientes continúan con grado moderado de severidad en la escala de severidad de Medsger.

La esclerosis sistémica como enfermedad reumática autoinmune comprende tres procesos que hasta el día de hoy siguen siendo estudiados autoinmunidad (inflamación), fibrosis y vasculopatía (pequeños vasos sanguíneos). Las anomalías en el sistema inmune han sido estudiadas; las respuestas de los linfocitos y sus citocinas han sido asociadas con la fisiopatogenia de la enfermedad y en algunos casos con la severidad de la enfermedad o incluso manifestaciones de afección en órganos específicos.²⁹

En biopsias de pacientes con ES de sitios con fibrosis, en fases tempranas de la enfermedad, se han encontrado linfocitos y macrófagos. Probablemente asociado a la respuesta inmunológica aberrante que resulta en la activación de los fibroblastos para aumentar de manera anormal los depósitos de matriz extracelular en los tejidos. Además de la fibrosis el proceso inflamatorio sobre todo a nivel del endotelio vascular forma parte de la triada fisiopatogenica de la ES; diversas células inflamatorias incluyendo a los linfocitos B y T entre otros han sido encontrados en las regiones perivascuales de los capilares en pacientes con ES.³⁰

Algunos factores asociados con anomalías del sistema inmunológico han sido identificados como son polimorfismos y halotipos del antígeno-leucocitario-humano (HLA) en genes reguladores inmunológicos como DRB1*1104, DQA1*0501, DQB1*0301 que además están asociados a hispanos.³¹

Células endoteliales, plaquetas, pericitos, células musculares lisas, fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos B, linfocitos T, monocitos macrófagos y células dendríticas han sido evaluadas como parte importante de la fisiopatogenia de la enfermedad; al igual que diversos mensajeros celulares como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor activador derivado de plaquetas (PDGF), mediadores vasoactivos (proteína de adhesión de células vasculares 1-VCAM1 y moléculas de adhesión intercelular-ICAM), IL-6 y IL-13, endotelina 1, angiotensina II, anticuerpos y, especies

reactivas de oxígeno entre otras han sido estudiadas y relacionadas con la ES de manera controversial.⁹

En nuestro estudio nos enfocamos en el análisis de linfocitos T reguladores y citocinas relacionadas con este fenotipo y su posible asociación con los hallazgos clínicos en adultos con ES (Cuadro 2). Un infiltrado de linfocitos T CD4+ (fenotipo Th1, Th2 y Th17), macrófagos, células dendríticas y células B activadas se ha observado en los tejidos con fibrosis asociada.⁹ De manera interesante se ha visto que la producción de citocinas se ve aumentada de manera directamente proporcional al incremento de la edad tanto en la niñez como en la edad adulta.³² Los linfocitos CD4+CD25+FoxP3+ reguladores (LTreg) inducen el mantenimiento de la tolerancia inmunológica constituyendo del 5-10% de total de células CD4+ en sangre periférica de individuos sanos.³³ En las últimas décadas se ha considerado la probable participación de los linfocitos T reguladores en la patogénesis de la ES. Se ha vinculado con los linfocitos Treg la capacidad de inhibir la proliferación y producción de citocinas por células CD4+CD25- y CD8+, mantener la tolerancia a componentes propios del individuo, control de enfermedades alérgicas, prevención de rechazo de aloinjertos y la regulación de la respuesta a diversos patógenos microbianos. También se han asociado con la producción de citocinas anti-inflamatorias como son IL-10, TGF- β entre otras.^{33 34} Sin embargo el papel de los linfocitos Treg en la esclerosis sistémica carece de argumentos suficientes para establecer su participación en la enfermedad.

Algunos estudios en ES han demostrado aumentos, pero no disminuciones en el porcentaje de LTreg. Nan Jiang y colaboradores en el 2014 observaron niveles significativamente más elevados de los L TCD4+CD25+FoxP3+ en los pacientes con ES en comparación con los controles. Los LTreg elevados correlacionaron además de manera positiva con la duración de la enfermedad. Adicionalmente observaron una asociación este incremento de linfocitos Treg con la presencia de enfermedad pulmonar intersticial (EPI), es decir fibrosis severa pulmonar en pacientes con ES. Este aumento resultaría en una cascada de activación celular y producción de citocinas capaces de activar linfocitos Th2 que pueden resultar en una excesiva producción de colágena por la activación y estimulación de la proliferación de fibroblastos, evidenciando su posible papel regulador en el proceso fibrótico de la ES.¹⁷

Slobodin G. y cols., en el 2010 observaron un aumento de las células CD4+CD25+FOXP3 reguladoras, pero también una correlación de esta elevación con mayor actividad y severidad de la esclerosis sistémica. Sin embargo este aumento no se reflejó en elevaciones en una mayor producción periférica de IL-10 y TGF- β 1 ni la duración de la enfermedad que fue temprana en la mitad de los casos y tardía en el otro 50% de los pacientes estudiados. (Figura 8) ¹⁸ Antiga E. y cols. contrario a lo ya mencionado demostraron menor proporción de Treg CD4+CD25+FoxP3+ en piel y sangre total de pacientes con ES, adicionalmente niveles significativamente bajos de TGF- β e IL-10 en comparación con sus controles.³⁵ De igual forma nuestro estudio mostró una disminución significativa de linfocitos Treg en comparación con individuos sanos, así como niveles significativamente menores de TGF- β 1 e IL-10. Dichas discrepancias pudieran ser explicadas por el tiempo de evolución o duración de la enfermedad de los sujetos estudiados, siendo mayor el tiempo de evolución en nuestra cohorte en comparación con los estudios mencionados.

El TGF- β 1 induce la proliferación, diferenciación y activación de los linfocitos CD4+CD25- y CD4+CD25+ LTreg. TGF- β es también un potente inductor de la expresión del factor de proliferación FOXP3. Por lo tanto al ser el TGF- β un factor inductor de FOXP3 y que se ha asociado con la fibrosis en ES, un aumento significativo de LTreg sería lo esperado.¹⁷ Gonzalo y cols. Sugieren El papel de TGF- β en la diferenciación de las diversas poblaciones de células T humanas es múltiple. Se ha demostrado que las vías de señalización a través de TGF- β 1 protege a las células Treg de la apoptosis, además de ser indispensable para inducir la expresión de FOXP3, ya que se ha observado que las células TCD4+ deficientes en TGF- β 1 no pueden generar células Treg in vivo en in vitro.³⁶ Otros estudios muestran producción de TGF- β sin diferencias significativas entre el grupo de control (individuos sanos) y pacientes con ES; ni correlación con la actividad y severidad de la enfermedad.¹⁸ Estudios *In vivo* han analizado como los fibroblastos dérmicos responden a TGF- β exógeno, cuando se compara con controles, los fibroblastos de pacientes con ES producen más glicosaminoglicanos cuando se tratan con TFG- β exógeno y se piensa que la acumulación de estos es un evento temprano en la patogénesis de la esclerosis sistémica.³⁷

El TGF- β es secretado como un complejo latente dimerizado, que también contiene una proteína de unión a TGF- β latente (LTGF- β). Este complejo puede unirse a la MEC, donde el TGF- β puede ser almacenado hasta que se activa, trombina y otras proteasas séricas activan TGF- β escindiendo LTGF- β .

El TGF- β 1 ejerce su efecto vía la heterodimerización de 2, receptores transmembranales primarios, el receptor de TGF- β tipo I (TGF β RI) y TGF β RII. Clásicamente, los receptores de TGF- β tienen su vía de señalización través de la ruta de SMAD.³⁷

Recientemente el TGF- β ha sido definido como una molécula reguladora involucrada en la diferenciación de células T inexpertos al linaje Th17.³⁸

Además una de las principales citocinas relacionadas con inducción de células reguladoras CD4 + CD25 + es el TGF- β . En un modelo *in vitro* con células de ratón, Chen y cols. demostraron que el TGF- β convierte a las células CD4 + CD25- en células reguladoras CD25 + , cuando han sido estimuladas a través de su TCR con anti-CD3 y un tercer estímulo como anti-CD28 o células presentadoras de antígeno. Las células reguladoras generadas por la estimulación con TGF- β 1 expresan FOXP3 dependiente de la dosis y presentan un fenotipo CD25^{high}, CTLA-4 intracelular ^{high}, TGF- β de membrana y CD45RB ^{high}-^{low}, similar al de las células reguladoras naturales.³⁸

En el 2010 Fantini y cols. Describieron que el estímulo con TGF- β 1 más anti-CD3 y anti-CD28 induce la expresión de FOXP3 en células CD4+CD25- murinas y humanas de sangre periférica con un fenotipo y una función reguladora.

La regulación del factor de transcripción Foxp3, depende del factor de transcripción NF-AT y la señalización de Smad-3 dependientes de TGF- β .³⁶

Estudios previos encontraron un aumento en los niveles séricos de TGF- β en pacientes con esclerosis localizada, pero no se observaron niveles elevados en pacientes con esclerosis sistémica.³⁸

En el estudio de Diziadzio y cols. los niveles de TGF- β en sueros de pacientes con ES, en comparación con sueros de pacientes con controles limitados y normales, no pudieron demostrar una correlación con el mRSS, aunque los valores fueron menores en los pacientes con difusa que en pacientes con esclerosis sistémica limitada y eran incluso más bajos que en los individuos normales.

Los datos presentados sugieren alteraciones en las funciones efectoras de los linfocitos Treg en adultos con ES sin importar el subtipo clínico de la enfermedad, además correlacionan con baja IL-10 intracelular y concentraciones disminuidas de TGF- β 1 a nivel periférico. Esta disminución en la expansión de linfocitos CD4+CD25+FoxP3+ reguladores y su producción de IL-10 puede ser debida por un lado a la evolución clínica tardía > de 5 años que tienen los pacientes; así como un contrario a lo esperado encontramos niveles de TGF- β 1 en pacientes con ES menores o similares al grupo control (Figura 10). TGF- β 1 que a su vez interfiere con sus vías de señalización teniendo posibles efectos supresores de la respuesta inmunológica en la activación de alguno de sus componentes como lo son las células T reg.

Nuestros resultados también podrían interpretarse en el contexto de la fisiología de TGF- β 1. El TGF- β 1 es secretado por macrófagos, linfocitos T, plaquetas y células endoteliales. El TGF- β 1 se genera a partir complejo TGF- β latente en sitios de lesión por una combinación de la proteólisis y de bajo pH. Una posible explicación del resultado obtenido es que el aumento de los sitios de unión activos puede reducir su nivel sérico en la ES ya que se tienen reportes que sugieren una mayor expresión de receptores de TGF- β en la ES pueda ocasionar que puede estar “secuestrada” en la piel unida a la MEC de los fibroblastos ya sea de forma activa o latente y esto ocasiona que los niveles séricos sean reducidos. Además un número de proteínas que interactúan con TGF- β como la fibrilina o decorina han sido encontradas elevadas en pacientes con ES.

Otra posible explicación es que las otras isoformas de TGF- β estén implicadas en el proceso de la fibrosis y en este estudio se analizó solo a TGF- β 1 y por lo tanto esta no se vea aumentada.

La presencia de niveles similares de TGF en controles sanos en este estudio sugiere que no es perjudicial y refuerza lo encontrado de que el TGF- β 1 puede ser importante, como un modulador de la respuesta inmune.

Cabe señalar que en este estudio se realizó con un kit comercial comúnmente usado para la determinación de TGF- β 1, el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), que detecta directamente la forma activa, después de activarla por acidificación o por tratamiento con urea. Este método constituye la mejor opción debido

a su simplicidad, especificidad y sensibilidad, sin embargo, existen algunas discrepancias en la literatura relacionadas con los factores que activan el TGF- β 1 latente in vitro e in vivo. Esto sugiere que los datos publicados reportando valores absolutos de TGF- β 1, basados sólo en ELISA, se deben interpretar cautelosamente.⁴⁰

7.2 Conclusiones

- Los subtipos clínicos de la enfermedad presentaban en un mayor porcentaje una evolución tardía y a pesar de presentar la evolución tardía en México presentan severidad de la enfermedad moderada.
- Los adultos con ES muestran niveles más bajos de LTreg y producción de IL-10 respecto a un grupo control.
- Aunque en los últimos años el conocimiento sobre el funcionamiento de los LTreg es más claro, su papel en la patogénesis de la Es aun no lo es, con los niveles encontrados, se refuerza la teoría sobre su posible participación en la de la respuesta inmune.
- Los niveles de IL-10 en comparación a un grupo control eran demasiado bajos con lo que se refuerza que los LTreg no logran desarrollar su función en ausencia de IL-10.
- Contrario a lo esperado, los niveles de TGF- β 1 no muestran una diferencia significativa en pacientes con ES respecto a un grupo control y esto se correlaciona con la actividad y evolución de la enfermedad, la propia fisiología de TGF β , así como la posible implicación de sus isoformas en el desarrollo de la enfermedad.
- Es de gran importancia correlacionar los valores de TGF- β y los porcentajes de LTreg, ya que esta citocina potencialmente pleiotrópica, además de inducir el fenotipo regulador, puede inducir el fenotipo Th17, lo que explicaría el descenso de los LTreg en pacientes con ES.
- Otra manera de correlacionar los valores de TGF- β y los porcentajes de LTreg, es debido a que TGF- β podría inducir la apoptosis de los LTreg con lo que el número de la primera permanece constante y los LTreg disminuyen.

BIBLIOGRAFIA

1. Garza V, Ocampo J, Villareal MA. Etiopatogenia y tratamiento de la esclerodermia. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 2013; 51(5):50-7
2. Serrano A. Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatol. Clínica* 2009; 5(S1):1-5
3. Sánchez RS, Butnaru D. Inmunología Modelos de reconocimiento inmunológico: tolerancia e inmunidad en el marco de la evolución del conocimiento científico. *J. Inmunol.* 2013; 32(4): 139-147
4. Connie RM, Diene T, Autoimmune diseases. 2006; Prentice Hall.
5. Jadue AN, Gonzáles I. Inmunopatogenia de las enfermedades autoinmunes *Rev. Med. Clini. Condes.* 2012; 23(4) 464-472 Roitt MI, Burton DR, Martin SJ, Delves PJ. *Inmunología fundamentos.* 2008; Médica Panamericana.
6. Domínguez O, Giner MT, Alsina L, Martín M, Lozano J, Plaza M. Fenotipos clínicos asociados a la deficiencia selectiva de IgA: revisión de 330 casos y propuesta de un protocolo de seguimiento. *An Pediatr.* 2012; 76(5):261-7.
7. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R. et al. Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *PLoS Med.* 2006;3(1): e2
8. Allanore Y, Distler O, Pope J, Simms R, Trojanowska M, Varga D. Systemic sclerosis. *Mac. Pub. Lim.* 2005 ;1(1):1-18
9. Turrión A, Martín R, Sánchez A. Esclerodermia. *Med.* 2013;11(32):1981-90
10. Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2012; 24(2):165-70.
11. Khanna D, Furst D, Allanore Y, Bae S, Bodukam V. et al. Twenty-two points to consider for clinical trials in systemic sclerosis, based on EULAR standards. *Rheum.* 2015;54(1):144-151

12. Diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la Esclerosis Sistémica. 2010; Secretaria de Salud.
13. Avouac J, Fransen J, Walker UA. Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group .Ann Rheum. Dis. 2011; 70(1):476-481. Gormaz JP, Gajardo P, Escobar A, Olavarría C, Schönfeldt P, et al. Perfil de producción de citoquinas en linfocitos T de sangre periférica de pacientes con poliposis nasal y asma bronquial en respuesta a la estimulación con enterotoxina estafilocócica B. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello 2010; 70: 195-204
14. Estrada RB, Escudero M, Connor JEO, Dasi F, Fenollosa B, et al. Estudio del patrón de citocinas (Th1 / Th2) producido por linfocitos T periféricos y del existente en tejido tumoral de pacientes con melanoma en diferentes estadios. Actas Dermosifiliogr. 2014; 93(2):87–101.
15. Jiang N, Li M, Zeng X. Correlation of Th17 cells and CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells with clinical parameters in patients with systemic sclerosis. J Chin. Med. 2014; 127(20):3557–61.
16. Slobodin G, Ahmad MS, Rosner I, Peri R, Rozenbaum M, Kessel A, et al. Regulatory T cells (CD4(+)CD25(bright)FoxP3(+)) expansion in systemic sclerosis correlates with disease activity and severity. Cell Immunol. Elsevier Inc. 2010; 261(2):77–80.
17. Radstake TRDJ, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, et al. Increased Frequency and Compromised Function of T Regulatory Cells in Systemic Sclerosis (SSc) Is Related to a Diminished CD69 and TGFβ Expression. PLoS One. 2009; 4(6):e5981.
18. Cordiali-Fei P, Mussi A, D'Agosto G, Trento E, Bordignon V, Trincone S, et al. Assessment of T regulatory cells and expanded profiling of autoantibodies may offer novel biomarkers for the clinical management of systemic sclerosis and

undifferentiated connective tissue disease. *Clin Dev Immunol.* 2013; 390563:1-7

19. Rêgo MJB, da Silva RR, Pereira MC, da Silva Araújo A, Pitta I da R, Falcão DA, et al. Evaluation of CD4+CD25+FoxP3+ T cell populations, IL-10 production, and their correlation with clinical and biochemical parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine.* 2015; 75(2):310–5.
20. Muris AH, Damoiseaux J, Smolders J, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, Thewissen M. Intracellular IL-10 detection in T cells by flowcytometry: The use of protein transport inhibitors revisited. *J Immunol Methods.* Elsevier B.V.; 2012; 381(1-2):59-65.
21. Vanegas A, Vásquez G. Smad y otros blancos terapéuticos en esclerodermia. *Rev. Colomb. Reumatol.* 2011; 18(4):285–94.
22. Saxena V, Lienesch D, Zhou M, Bommireddy R, Azhar M et al. Dual roles of immunoregulatory cytokine TGF-beta in the pathogenesis of autoimmunity – mediated organ damage. 2008; *J Immunol.* 180(3): 1903–1912.
23. Varga J, Pasche B. Transforming growth factor-β as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009; 5(4): 200–206.
24. Nikpour M, MBBS, FRCPA, Stevens WM, Herrick AL, Proudman SM. Epidemiology of Systemic Sclerosis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2010; 24: 857-869
25. Foeldvari I. New Developments in Juvenile Systemic and Localized Scleroderma. *Rheum Dis Clin N Am* 2013; 39:905-920---
26. Gourh P, Arnett F.C, Assassi S, Tan FK, Huang M, Diekman L, Mayes MD, Reveille JD, Agarwal SK. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and.
27. Foeldvari I. New Developments in Juvenile Systemic and Localized Scleroderma. *Rheum Dis Clin N Am* 2013; 39:905-920
28. O'Reilly S. Innate Immunity in systemic sclerosis pathogenesis. *Clinical Science* 2014; 126:329-337.

29. Nikpour M, MBBS, FRCPA, Stevens WM, Herrick AL, Proudman SM. Epidemiology of Systemic Sclerosis. Best Practice & Research Clinical Rheumatology 2010; 24: 857-869.
30. Hoffmann F, Albert M.H, Arenz S, Bidlingmaier C, Berkowicz N, Sedlacek S, Till H, Pawlita I, Renner E.D, Weiss M, Belohradsky. Intracellular T-cell cytokine levels are age-dependent in healthy children and adults. Eur. Cytokine Netw 2005; 16(4):283-8
31. Pandiyan P, Zhu J. Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3+ regulatory cells. Cytokine 2015; 76:13-24.
32. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology 2007; 148:32-46
33. Antiga E, Quaglino P, Bellandi S, Volpi W, Del Bianco E, Comessatti A, Osella-Abate S, et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic and morphea. British Journal of Dermatology 2010; 162:1056-1063
34. Gonzalo-Gil E, Galindo-Izquierdo M. Papel del factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β) en la fisiopatología de la artritis reumatoide. Reumatol Clin 2014; 10(3):174-179
35. Lichtman, M. K., Vinas O M, & Falanga V. Transforming growth factor beta isoforms in wound healing and fibrosis, Wound Rep Reg 2015
36. Kurzinski, K., & Torok, K. S. Cytokine profiles in localized scleroderma and relationship to clinical features. Cytokine 55 (2011) 157–164
37. Dziadzio M, Smith RE, Abraham DJ, Black CM, & Denton CP. Circulating levels of active transforming growth factor β 1 are reduced in diffuse cutaneous systemic sclerosis and correlate inversely with the modified Rodnan skin score, Rheumatology 2005;44:1518–1524 Zamora R, Barclay D, Vodovotz Y, Diferencias en la activación del Factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1) por el ácido y el calor .Revista Med(2007) 15 (2): 177-179, 2007

ANEXO

I.- PROGRAMA DE TRABAJO

1.- CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO:

Ubicación temporal- espacial

El presente estudio de investigación se realizó en UMAE Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”, Centro Médico Nacional “La Raza”, y el Hospital General “Gaudencio González Garza” CMN La Raza, en pacientes en seguimiento por la consulta externa de medicina interna y reumatología con diagnóstico de esclerosis sistémica

II.- FACTIBILIDAD Y ASPECTOS ÉTICOS:

Este protocolo está diseñado con base en los principios éticos para las investigaciones en seres humanos Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975, 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983, 41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989, 48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996, 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000. Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002, Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004, 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008. Igualmente se realiza en con base en a-la Ley General de la República Mexicana. En referencia a Ley General de Salud los aspectos éticos de la investigación en seres humanos CAPITULO UNO, ARTÍCULO 17(Ley General de Salud 2007, actualmente abrogada), se considera como riesgo en la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio. Para este estudio se clasifica a nuestra investigación con riesgo mínimo. El cual representa un estudio prospectivo que emplea el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes

físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: extracción de sangre por punción venosa en adultos, exploración física, toma de biopsia cutánea. Por lo antes expuesto es necesaria la presentación del consentimiento informado, documento que deberá ser explicado por el investigador, y firmado por el sujeto de investigación. Este documento será presentado más adelante.

Todos los datos obtenidos en el estudio serán de carácter confidencial. Los resultados obtenidos serán utilizados únicamente con fines de investigación clínica. El protocolo de investigación adicionalmente cuenta con dictamen de **AUTORIZADO** ante el **Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3501** del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional La Raza, D.F. Norte. Con el No. de registro: **R-2014-3501-105**



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

CONSENTIMIENTO INFORMADO (Adulto)

Por medio de la presente **acepto participar** en el protocolo de investigación titulado:

Nombre del estudio: “EFECTOS INMUNOMODULADORES DE LA VITAMINA D3 EN ADULTOS CON ESCLERODERMIA E HIPOVITAMINOSIS D”

Número de registro: _____ Registrado ante el Comité Local de Investigación Científica del IMSS. Hospital de Especialidades CMN “La Raza.

Lugar y fecha:

México, D.F. a ____ del
mes de _____ 201__

Justificación:

Usted es un paciente con esclerosis sistémica y es por ello que lo invitamos a participar en este estudio. La enfermedad que usted padece, se acompaña de alteraciones digestivas que impide que se absorban bien los alimentos, entre ellos la vitamina D. La vitamina D es muy importante para mantener sanos los huesos, pero recientemente se ha visto que también es importante para mantener en equilibrio de nuestras defensas inmunológicas. Por lo anterior realizaremos el presente estudio inicialmente para saber si usted tiene baja la vitamina D en su sangre. En otra etapa para medir sus defensas antes y después de que usted reponga la vitamina D en su sangre con tabletas o bien con dieta.

Objetivos:

Con la realización del presente estudio se podrá saber si la vitamina D tiene efectos benéficos sobre su enfermedad y su sistema inmune; y de ser así poder tomar las medidas pertinentes en su tratamiento de usted y de otras pacientes con esclerodermia.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

Permitir que se realice revisión física completa, toma de muestras sanguíneas de aprox. 5ml en cuatro ocasiones dos veces al inicio, una al mes, otra a los 4 meses. Después de saber su resultado y si tiene baja la vitamina D en sangre la asignaremos al azar a tomarla por vía oral en tabletas de 5000 UI de vitamina D diaria durante cuatro meses o a cambiar su dieta para que contenga más vitamina D de lo que suele comer, además de mi tratamiento habitual para la enfermedad. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: En relación de toma de muestras de laboratorio, los posibles riesgos son: dolor, moretón, sangrado, e infección. El posible beneficio del estudio: saber si tengo normal o baja la vitamina D en mi sangre, y en caso de tenerla baja saber si puedo reponerla con dieta o medicamentos según me toque. Y finalmente conocer si al reponerla a lo normal esto tiene buenos efectos en mis defensas y en mi enfermedad.

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento. Participación o retiro: Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. Privacidad y confidencialidad: El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participantes podrá dirigirse a: Investigador Responsable (Dra. María del Pilar Cruz Domínguez, al Teléfono: 0445523290769). (Dra.