



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y DE LA NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRAN**

CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN REUMATOLOGÍA

ANÁLISIS DEL PERFIL INMUNOLÓGICO DE PACIENTES CON LUPUS

ERITEMATOSO GENERALIZADO Y SU RELACIÓN CON

COMPLICACIONES INFECCIOSAS

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
REUMATOLOGÍA**

PRESENTA:

DANIEL GEOVANI VÁSQUEZ LÓPEZ

ASESOR DE TESIS

DRA. MARINA RULL GABAYET

COASESOR

DR JOSÉ JIRAM TORRES RUIZ

CIUDAD DE MEXICO, JULIO DE 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

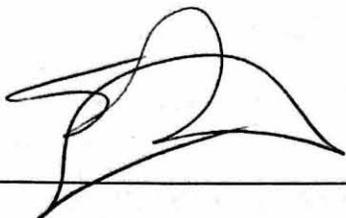
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

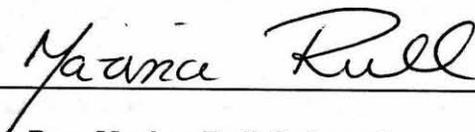
AUTORIZACIÓN DE TESIS

“ANÁLISIS DEL PERFIL INMUNOLÓGICO DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO Y SU RELACIÓN CON COMPLICACIONES INFECCIOSAS”



Dr. Sergio Ponce de León Rosales

Titular de la Unidad de Enseñanza INCMNSZ



Dra. Marina Rull Gabayet

Profesor Titular del Curso de Reumatología

Jefe de Departamento de Reumatología e Inmunología INCMNSZ

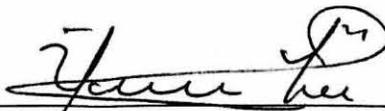


Dra. Marina Rull Gabayet

Tutor de Tesis

Profesor Titular del Curso de Reumatología

Jefe de Departamento de Reumatología e Inmunología INCMNSZ



Dr. Daniel Geovani Vásquez López

Residente de Segundo Año de Reumatología INCMNSZ

ÍNDICE

Resumen	4
Antecedentes	6
Planteamiento del problema	14
Justificación	14
Hipótesis	14
Objetivos	14
Objetivo General	14
Objetivos Específicos	15
Objetivos Secundarios	15
Métodos	15
Criterios de inclusión:	16
Criterios de exclusión:	16
Evaluación inmunológica	17
Análisis estadístico	18
Resultados	19
Discusión	27
Conclusiones	29
Bibliografía	30

Resumen

Objetivo: Determinar si los pacientes con LEG que desarrollan infección presentan alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos y monocitos, así como en la fagocitosis, NETosis y estallido respiratorio en neutrófilos y en la fagocitosis de monocitos.

Metodología: Se realizó un estudio exploratorio de 22 pacientes para evaluar el efecto de las dosis variables de esteroides y de actividad de la enfermedad así como la profilaxis antibiótica en los parámetros inmunológicos de pacientes con LEG y su relación con la predisposición al desarrollo de infecciones. La evaluación de los parámetros inmunológicos se realizó antes de iniciado el tratamiento y al final de los primeros 6 meses del mismo. En cada visita se tomó una muestra de 30 mL de sangre venosa periférica anticoagulada con heparina no fraccionada, mediante venopunción. Se separaron las células mononucleares (CMN) por centrifugación a través de gradientes de densidad (Ficoll-Hypaque). Los neutrófilos fueron aislados mediante sedimentación con dextrán posterior a la lisis de eritrocitos con solución salina hipotónica. Posteriormente se evaluaron los siguientes parámetros: Inmunofenotipificación linfocitaria T, B, NK por citometría de flujo, ensayo de fagocitosis, cuantificación estallido respiratorio de neutrófilos.

Resultados: El porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ se incrementó cuando los pacientes se encontraron con actividad baja de la enfermedad y con dosis bajas de prednisona. Los pacientes con mayor cantidad de LDG en los momentos de exacerbación de la enfermedad tienen mayor predisposición a infecciones. Las infecciones recurrentes se relacionaron a mayor índice CD4/CD8 al momento de actividad de la enfermedad con una p menor a 0.006. Los pacientes con infecciones graves tuvieron mayor cantidad de neutrófilos con estallido respiratorio en números absolutos con una $p=0.08$. La fagocitosis en neutrófilos y monocitos disminuye al momento de alcanzar el periodo de respuesta clínica y al bajar la dosis de prednisona, con un $p=0.031$ para el porcentaje de monocitos con fagocitosis y $p=0.09$ para el número absoluto de monocitos con fagocitosis. Hubo una tendencia al aumento del porcentaje de neutrófilos que

presentan estallido respiratorio posterior a la respuesta clínica y al consumo de dosis bajas de esteroides. Se encontró una correlación negativa débil entre la dosis de prednisona y los números absolutos de monocitos con fagocitosis con una p 0.07, R^2 de 0.21.

Conclusiones: En pacientes con LEG, hay un aumento en la fagocitosis durante episodios de actividad de la enfermedad en la que se administran dosis altas de esteroides. Los parámetros de fagocitosis y estallido respiratorio no se relacionaron con el desarrollo de infección.

Palabras clave: Lupus eritematoso generalizado, trimetoprim sulfametoxazol, fagocitosis, NETosis, estallido respiratorio.

Análisis del perfil inmunológico de pacientes con lupus eritematoso generalizado y su relación con complicaciones infecciosas

Antecedentes

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune crónica y multisistémica cuya incidencia anual en Estados Unidos se reporta de 2 a 7.6 pacientes por cada 100000 personas y prevalencia desde 19 a 159 pacientes por cada 100000 personas. La relación mujer/hombre es de 9/1.

La mortalidad en pacientes con LEG ha mejorado en los últimos 30 años. Las principales causas de mortalidad son por actividad de la enfermedad, infecciones y complicaciones cardiovasculares. En la cohorte GLADEL de pacientes de latino América la actividad de la enfermedad e infecciones son las principales causas de muerte (44%), seguidas por actividad de la enfermedad sola (35%), infección sola (15%) y malignidad (3%). [1].

Infecciones en pacientes con LEG.

Las infecciones están entre las principales causas de hospitalización cerca del 20% y representan del 25 al 50% de la mortalidad en pacientes con lupus eritematoso generalizado. En general, las infecciones bacterianas son las más frecuentes, seguidas por las virales, fúngicas y por protozoarios. Los principales microorganismos aislados en pacientes con LEG son: *S. pneumoniae*, *E. coli*, *Pseudomonas spp*; Herpes zoster, CMV, y VPH, *Candida spp*, *P. jirovecci*, y *C. neoformans*, siendo el tracto respiratorio y urinario los sitios más frecuentemente afectados.[2]

Se han descrito diversos factores de riesgo para infección en los pacientes con LEG como son: actividad de la enfermedad con alto puntaje de SLEDAI, títulos elevados de anti - DNA de doble cadena, niveles bajos de complemento, nefritis lúpica, neutropenia, linfopenia, tratamiento con corticoesteroides, pulsos de corticoesteroides, y altas dosis de ciclofosfamida) [3].

En una cohorte de 110 pacientes coreanos 42 (38%) tuvieron al menos un episodio de infección. La incidencia de infección fue del 4.4/100 pacientes año. En el análisis multivariado, los predictores independientes de infección durante el diagnóstico de LEG, fueron un SLEDAI >12 ($p = 0.01$), niveles de C3 < 90 mg/dL ($p=0.01$) y anti DNA positivos ($p <0.01$) [4]

Se han realizado estudios para investigar la incidencia de infecciones oportunistas en pacientes con LEG que reciben diferentes dosis de corticoesteroides. En un estudio en Taiwán se encontró que la incidencia acumulada de infecciones oportunistas fue 136 veces más alta en el grupo con esteroides que en el grupo sin esteroides, con un riesgo relativo para infecciones oportunistas de 1.4 (95% IC 0.78-2.51) en pacientes que tenían prednisona de 7.5-15 mg, 1.72 (95% IC 1.02-2.91) para una dosis de prednisona de 15-30 mg, 1.96 (95% IC 1.17-3.28) para una dosis de prednisona de 30-60 mg y 2.24 (95% IC 1.26-4) para más de 60 mg de prednisona . [5].

Profilaxis con trimetoprim sulfametoxazol en pacientes con lupus eritematoso generalizado.

Debido al alto riesgo de infecciones en pacientes tratados con dosis elevadas de corticoesteroides existen recomendaciones a tomar en consideración, como la aplicación de vacunas contra influenza, *S. pneumoniae* y hepatitis B y el uso de tratamiento profiláctico para *P. jirovecii* en grupos específicos.

La infección por *Pneumocystis jirovecii* es poco común pero pone potencialmente en riesgo la vida de pacientes inmunocomprometidos. En pacientes sin VIH el factor de riesgo más importante es el uso de fármacos inmunosupresores, especialmente corticoesteroides. Otros factores que se han encontrado asociados a esta infección en pacientes con lupus son actividad de la enfermedad en particular renal y hematológica con linfopenia de CD4+.

No existe un consenso para el uso de tratamiento profiláctico en pacientes con enfermedades reumatológicas. En la práctica actual el iniciar profilaxis contra *P. jirovecii* cuando se usan dosis mayores a 16 mg de prednisona por más de 8 semanas se apoya en el estudio de la Clínica Mayo de 1996, que incluyó pacientes con neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (NPJ) entre 1985

y 1991 (HIV negativo), 90% tomó corticoesteroides en el mes previo a la infección. La media de dosis de esteroide en pacientes con NPJ (Neumonía por Pneomocisti Jirovecii) fue de 30 mg/día, y la duración media de tratamiento previo al desarrollo de NPJ fue de 12 semanas. Veinticinco por ciento de estos pacientes recibieron solo 16 mg y 25% desarrollo NPJ en 8 semanas o menos. Sin embargo, este estudio tuvo pocos pacientes con enfermedad autoinmune y muchos con enfermedades hematológicas. [6]

Aún hay poca evidencia de la incidencia de esta infección en pacientes con enfermedades autoinmunes, algunos estudios retrospectivos como los de Li Ching y cols, encontraron una incidencia de NPJ de 75 por 100000 pacientes año, con una mortalidad hospitalaria del 50%. Todos los pacientes que fallecieron tenían altas dosis de corticoesteroides al momento del diagnóstico de NPJ. Hubo un aumento en la incidencia en los pacientes que tenían altas dosis de corticoesteroides vs los que no, con un riesgo relativo de 19 (P= 0.01; 95% IC, 2-182.8). El promedio de dosis de prednisona en pacientes que desarrollaron NPJ frente a los que no fue de 55.5 vs 10.7 mg, respectivamente (P= 0.002) [7]. Ogawa y col encontraron en su estudio retrospectivo de pacientes con enfermedades autoinmunes que recibían más de 30 mg de prednisona que la dosis inicial de prednisona, el conteo de linfocitos a las 2 semanas (<500/microl), y el uso de inmunosupresores durante más de dos semanas después del inicio de esteroides son factores de riesgo independientes que contribuyen al desarrollo de NPJ. Además, hubo una disminución del riesgo de NPJ en pacientes con profilaxis con TMP-SMX [8]. En Tailandia se estudiaron 138 episodios de riesgo de 132 pacientes con enfermedades autoinmunes; 59 pacientes recibieron TMP-SMX y 79 no, encontrándose que los 6 casos de NPJ fueron en el grupo sin profilaxis, con una incidencia promedio de 4.3%. La diferencia en la incidencia entre los dos grupos fue significativa (P=0.038). En este estudio la mayoría de los pacientes tenían LEG, 53 en el grupo de profilaxis y 71 en el grupo sin profilaxis. De las características de los pacientes con LEG y profilaxis, se encontró que el 69.8% tenían un SLEDAI-2K mayor o igual a 6, 47.2% tenían nefritis lúpica, 13.2% anemia hemolítica autoinmune,

3.8% actividad gastrointestinal, y 17% actividad neuropsiquiátrica sin diferencias significativas con el grupo sin profilaxis. [9]

En Corea se realizó un estudio cuyo objetivo fue investigar la eficacia y seguridad de Trimetoprim sulfametoxazol (TMP-SMX) como profilaxis primaria para NPJ en pacientes con enfermedades reumatológicas que reciben altas dosis de esteroides. Se estudiaron 1522 episodios de tratamiento prolongado (≥ 4 semanas) con altas dosis de esteroide (≥ 30 mg día) en 1092 pacientes en un periodo de 12 años. Hubo 262 episodios de profilaxis con TMP-SMX, durante el periodo de seguimiento de 1474.4 personas año y 30 casos de NPJ con una mortalidad del 36.7% y menor incidencia en el grupo TMP-SMX (HR =0.07 (95% IC 0.0006 a 0.71). La incidencia de efectos adversos asociados al fármaco fue de 21.2 (14.8-29.3)/100 personas años, con solo dos efectos adversos graves, uno de estos fue Steven Johnson. En este estudio la mayoría de los pacientes del grupo con profilaxis tenía el diagnóstico de lupus eritematosos generalizado (n=122, 46.8%). [10]. La eficacia de TMP_SMX también se ha reportado en otros estudios en pacientes con alguna enfermedad autoinmune como en la granulomatosis con poliangiitis. Incluso hay recomendaciones por EULAR para profilaxis con TMP SMX en pacientes tratados con ciclofosfamida. Sin embargo, aún no se cuenta con un estudio que evalúe esto en LEG [11, 12]

Papel de los monocitos y neutrófilos para la predisposición a infecciones en pacientes con lupus eritematosos generalizado.

Además de los factores de riesgo para infecciones anteriormente comentados en pacientes con lupus eritematoso generalizado, se han descrito defectos intrínsecos del sistema inmune que incrementan el riesgo, jugando un papel importante los macrófagos y neutrófilos. [13]

Los monocitos son un componente clave del sistema inmune innato involucrado en la regulación de la respuesta inmune adaptativa. Estos son derivados de las células mieloides y están

equipados de sensores diseñados para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), la activación de estos receptores produce un amplio espectro de citocinas y quimiocinas. Además, los monocitos tienen la capacidad de presentar antígenos por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) siendo un vínculo importante entre la inmunidad innata y adaptativa.[13]

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en el cuerpo humano estos se desarrollan en la médula ósea y una vez liberados a la circulación se encargan de la protección contra patógenos y son considerados la primera línea de defensa inmune. Estas células tienen un citoplasma ricamente granulado y un núcleo lobulado y contienen varios tipos de gránulos que almacenan enzimas y péptidos antimicrobianos. La fusión de los gránulos con la membrana plasmática exterioriza su contenido en un proceso denominado degranulación. El complejo NADPH oxidasa también se recluta a la superficie de la vacuola donde produce especies reactivas de oxígeno. La respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos es un proceso de múltiples etapas que involucran la adhesión inicial de las células circulantes al endotelio vascular activado seguida por su extravasación y migración hacia el foco inflamatorio y por último la destrucción in situ de microorganismos extraños. La eliminación de microbios ocurre a través de diversos procesos que incluyen la fagocitosis, generación de especies reactivas de oxígeno por el estallido respiratorio y el incremento de sustancias microbicidas de los gránulos citoplasmáticos, además de un proceso caracterizado por la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). [14]

En pacientes con lupus se han reportado anomalías cualitativas en la función de los neutrófilos. Los sueros de pacientes con LEG inducen una mayor agregación de neutrófilos en comparación con pacientes sanos e interfieren con la fagocitosis y liberación de enzimas lisosomales por los neutrófilos normales. Los neutrófilos in vitro tienen una capacidad fagocítica deteriorada además de una depuración aberrante de material apoptótico por los fagocitos, los cuales se han propuesto juegan un papel importante en la patogenia del LEG. [13, 14]

Además, se ha descrito la importancia de subpoblaciones de neutrófilos como son los granulocitos de baja densidad los cuales están presentes en preparaciones de sangre periféricas de pacientes con LEG. Los LDGs son distinguidos de los monocitos con base en la alta expresión del marcador de neutrófilos CD15 y su baja expresión de CD14. Además, los LDGs derivados de pacientes con LEG expresan CD10 y CD16 pero carecen de expresión de MHC de clase II y CD86. Los LDGs expresan similares marcadores de superficie celular de maduración, aunque estos se diferencian de otras células por su morfología nuclear, la cual es similar a un fenotipo inmaduro. Los LDGs tienen un fenotipo pro-inflamatorio caracterizado por la secreción de TNF así como como IFN tipo I y II tras la estimulación que podrían promover y aumentar el daño celular. Además, los LDG tienen una mayor capacidad para matar células endoteliales al contacto célula-célula y una capacidad incrementada para formar NETs. [15]

La capacidad fagocítica de los monocitos y neutrófilos es esencial para la defensa del huésped contra patógenos así como para la depuración de células muertas. Tras la activación del sistema inmune a través de PAMPs los monocitos migran al sitio de infección e inician la fagocitosis. El reconocimiento celular de componentes de patógenos por moléculas de superficie como son los receptores de manosa, integrinas y receptores scavenger pueden inducir directamente la captación de microbios. Además la opsonización por anticuerpos y complemento estimula la fagocitosis vía recetores de complemento y receptores Fc en la superficie de células fagocíticas. De forma similar las células apoptóticas y necróticas son eliminadas por fagocitosis. [16]

La fagocitosis es un proceso activo que supone la extensión de la membrana del neutrófilo (formación de filopodios y lamelipodios) y la invaginación del neutrófilo en el lugar del objetivo. La implicación de los receptores del complemento y de FcγR causa la activación de distintas vías de señalización que ejercen misiones diferenciadas en la fagocitosis. Mientras que la implicación de CR3 (CD11b/CD18) produce la formación e invaginación de fibras de estrés de actina, la de

FcγRII provoca principalmente la extensión de las membranas próximas al objetivo y a su alrededor. [16]

La depuración inefectiva de células muertas puede condicionar una fuente de autoantígenos para el desarrollo de una respuesta autoinmune patogénica. Esta depuración anormal ha sido demostrada en paciente con LEG, con defectos intrínsecos en la depuración. Después de la unión normal a la superficie de células apoptóticas, los macrófagos de pacientes con lupus tienen una capacidad reducida para internalizar éstos comparado con pacientes sanos. Este defecto puede ser parcialmente explicado por una reducida expresión de CD22 en monocitos. CD44 media la depuración de neutrófilos apoptóticos por monocitos y la disminución de la expresión de esta molécula es encontrada en pacientes con lupus. Un defeco intrínseco de la fagocitosis también ha sido encontrado en macrófagos derivados de células hematopoyéticas CD34+ en pacientes con lupus.[17]

El estallido respiratorio es el proceso por el cual radicales libres son generados dentro del fagosoma y en la superficie celular. Un radical libre es cualquier molécula que es capaz de existir independientemente que contenga uno o más electrones no apareados. Los electrones no apareados alteran la reactividad química de la molécula haciéndola más reactiva que la forma no radical. Los radicales libres de oxígeno incluyen el radical anión superóxido(O₂⁻) , simplete de oxígeno, radical hidroxilo(OH) y radical perhidrocilo (HO₂) Estos iones son directa e indirectamente citotóxicos para las bacterias y su producción también activa otros mecanismos antibacterianos. [18]

Las especies reactivas de oxígeno son generados por la NADPH oxidasa, un complejo multiproteico que comprende componentes de membrana y citosólicos. El heterodímero asociado a la membrana citocromo b558 consiste en las subunidades gp91 phox y p22phox, y es esencial para la transferencia de electrones de NAPH a la molécula de oxígeno. El componente citosólico p47phox, p67phox, p40phox y las proteínas pequeñas G Rac1 y Rac2 son requeridas

para la activación completa. Además de las propiedades directas microbicidas de las especies reactivas de oxígeno estas moléculas también juegan un papel importante en la formación de NETS.[19]

Deficiencias en alguna de estas subunidades del complejo causan la enfermedad granulomatosa crónica, una severa inmunodeficiencia caracterizada por la predisposición a infecciones graves pero también por manifestaciones autoinmunes como son la enfermedad inflamatoria intestinal y su causa más común es la deficiencia de gp91phox ligada al X. [20]

El estudio del estallido respiratorio no solo es importante para comprender la inmunidad contra infecciones sino que también está asociada a enfermedades autoinmunes. Las variantes de codificación en la subunidad p67phox se asocian con aumento del LEG y esto es consistente con los datos que sugieren que la deficiencia de gp91phox predispone al lupus. Es posible que la producción de autoanticuerpos sea el resultado de un ataque de las ERO al DNA lo que provoca cambios en la estructura a nivel macromolecular. Las ERO generadas por las célula fagocíticas pueden causar daño al DNA y favorecer la producción de autoanticuerpos contra DNA. Alternativamente un defecto en el control de la apoptosis y la depuración retardada de las células apoptóticas proporciona una interacción sostenida entre radicales libres y las macromoléculas de células apoptóticas, incluido el DNA que genera neoepítopes que posteriormente producen autoinmunidad y generación de autoanticuerpos. [21].

En conclusión, la mayoría de los estudios que han evaluado factores de riesgo para infecciones bacterianas en LEG han sido transversales o retrolectivos y no han tomado en cuenta las anomalías en la inmunidad innata y en linfocitos para el desarrollo de infecciones bacterianas graves en LEG, por lo que surge la necesidad de llevar a cabo un estudio prolectivo que integre dichas alteraciones en el cuadro fisiopatológico de la predisposición a infecciones en pacientes con LEG.

Planteamiento del problema

Hasta el momento se desconoce la interacción entre el efecto del consumo de dosis altas de esteroides, la actividad de la enfermedad y profilaxis antibiótica sobre el funcionamiento del sistema inmune innato (monocitos y neutrófilos), proporción de linfocitos y el desarrollo de infecciones en pacientes con LEG.

Justificación

Existe evidencia de que las alteraciones inmunológicas de pacientes con LEG son predisponentes a infecciones independientemente del tratamiento inmunosupresor. Estudiar la relación entre alteraciones de la inmunidad en pacientes con LEG y el desarrollo de infecciones permitirá identificar un grupo de sujetos que se beneficien del uso de medidas profilácticas inclusive aquellos que no se encuentren en tratamiento inmunosupresor intensivo.

Hipótesis.

La presencia de alteraciones inmunológicas en subpoblaciones de linfocitos, fagocitosis, estallido respiratorio y NETs se asociará a un mayor riesgo de infecciones en pacientes con LEG a pesar de la profilaxis con Trimetoprim Sulfametoxazol.

Objetivos.

Objetivo General

Determinar si los pacientes con LEG que desarrollan infección presentan alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos y monocitos, así como en la fagocitosis, NETosis y estallido respiratorio en neutrófilos y en la fagocitosis de monocitos.

Objetivos Específicos

1. Determinar si el uso de esteroides a dosis variables tienen algún efecto sobre el perfil inmunológico de pacientes con LEG.
2. Estudiar si la profilaxis con trimetoprim/sulfametoxazol tiene efecto inmunomodulador en pacientes con LEG.

Objetivos Secundarios

1. Determinar la eficacia y seguridad de la profilaxis con trimetoprim/sulfametoxazol sobre el desarrollo de infecciones graves no virales en pacientes con LEG
2. Evaluar si el estallido respiratorio y fagocitosis de neutrófilos tiene capacidad predictiva para infecciones en pacientes con LEG independientemente del tratamiento inmunosupresor y la profilaxis antibiótica.

Métodos

El estudio de profilaxis antibiótica en pacientes con LEG es un ensayo clínico aleatorizado doble ciego del uso de TMP-SMX 3 veces por semana, comparado con placebo en pacientes con LEG acorde a los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) [27] que reciban una dosis igual o $>10\text{mg/día}$ de prednisona por al menos 8 semanas. Se evaluará el impacto del tratamiento profiláctico en la incidencia de infecciones graves, no virales. Los desenlaces primarios del estudio incluyen la presencia de infección (manifestaciones clínicas y estudios de gabinete sugerentes de infección con aislamiento microbiológico confirmado. En ausencia de este último, se diagnosticará infección como el conjunto de manifestaciones clínicas y estudios de gabinete compatibles con respuesta a antibióticos) o de infección grave (diseminada, que requiere hospitalización u ocasione la muerte).

Dentro de este protocolo, se realizó un estudio exploratorio de 22 pacientes para evaluar el efecto de las dosis variables de esteroides y de actividad de la enfermedad así como la profilaxis antibiótica en los parámetros inmunológicos de pacientes con LEG y su relación con la predisposición al desarrollo de infecciones.

El protocolo fue sometido al comité de investigación y ética del Instituto y fue aprobado.

Criterios de inclusión:

1. Hombres y mujeres mayores de 18.
2. Con LEG según los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR).
3. Que reciban dosis de $\geq 15\text{mg/día}$ de prednisona al día (o su equivalente) y se espera la recibirán por al menos un mes.
4. Que hayan dado su consentimiento informado y firmado el documento.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con síndrome de sobreposición excepto síndrome antifosfolípido
2. Contraindicación absoluta para recibir TMP-SMX (i.e. alergia conocida, trombocitopenia inducida por sulfonamidas o trimetoprim)
3. Haber recibido TMP-SMX como tratamiento antibiótico en el mes previo al reclutamiento
4. Depuración de creatinina $<30\text{ mL/min/m}^2$
5. Infecciones virales crónicas (VHC, VHB, VIH)
6. Neoplasia maligna activa, excepto en piel.
7. Inmunodeficiencias primarias.
8. Pacientes postrasplante de órgano sólido y médula ósea.
9. Embarazo o puerperio.
10. Infección activa, excepto infecciones activas leves que a juicio del investigador principal no comprometan los desenlaces del estudio (ej. Tiñas).

11. Infección crónica no controlada, (e.j. TB en tratamiento en fase intensiva), excepto infecciones crónicas leves que a juicio del investigador principal no comprometan los desenlaces del estudio (ej. Onicomicosis).
12. Infección crónica controlada que para su tratamiento o prevención se requiera el uso de Trimetoprim-Sulfametoxazol.
13. Pacientes que cuenten con neutrófilos totales menor de 750/mm³, plaquetas <30X10⁹/L, Hemoglobina <7g/dl.
14. Pacientes que estén tomando metotrexate.
15. Pacientes que estén participando en otro estudio de investigación que a juicio del investigador principal pueda interferir con la eficacia o seguridad de la intervención.

Evaluación inmunológica

La evaluación de los parámetros inmunológicos se realizó antes de iniciado el tratamiento y al final de los primeros 6 meses del mismo. En cada visita se tomó una muestra de 30 mL de sangre venosa periférica anticoagulada con heparina no fraccionada, mediante venopunción. Se separaron las células mononucleares (CMN) por centrifugación a través de gradientes de densidad (Ficoll-Hypaque). Los neutrófilos fueron aislados mediante sedimentación con dextrán posterior a la lisis de eritrocitos con solución salina hipotónica. Posteriormente se evaluaron los siguientes parámetros:

1. Inmunofenotipificación linfocitaria T, B, NK por citometría de flujo. Posterior al aislamiento de CMN, se marcaron con los siguientes anticuerpos fluorescentes: CD3-APC/H7, CD4 BB515, CD8 PE-CF594, CD19 APC, CD56 PE. Las células B fueron CD19+ y las NK CD56+/CD16+ en la población de CD3-, mientras que en la población de CD3+ se determinaron los porcentajes de CD4 y CD8+.
2. Ensayo de fagocitosis. Las células mononucleares totales fueron incubadas con 100 µL de partículas de E. coli marcadas con un colorante sensible a pH (pHrodo™ Escherichia coli BioParticles®). Se determinó el porcentaje de monocitos (CD14+) con fagocitosis y la intensidad

media de fluorescencia (IMF) del fluorocromo. El mismo procedimiento se llevó a cabo en neutrófilos (CD49d+) posterior a la sedimentación con dextrán.

3. Cuantificación estallido respiratorio de neutrófilos. En este ensayo, se empleará dihidrorodamina 123 (DHR 123), la cual es una tinción no fluorescente, permeable que es capaz de emitir fluorescencia cuando se convierte en el componente Rhodamina 123 al estar en contacto con especies reactivas de oxígeno en cualquier célula capaz de producir NADPH oxidasa. Los neutrófilos se resuspendieron en el buffer de estallido, se estimularon con PMA 200 nM y se marcaron dihidrorodamina (DHR). El porcentaje de neutrófilos con estallido respiratorio y la IMF del fluorocromo se evaluaron mediante citometría de flujo. Todas las muestras serán adquiridas en un citómetro BD LSR Fortessa, con 4 láseres y se analizarán con apoyo del software Flow-Jo.

4. Cuantificación de NETs. Los neutrófilos se sembraron en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina. Se incubaron con RPMI y LPS (1mg/ml) para inducir la formación de NETs. Posteriormente se realizó inmunofluorescencia indirecta (IFI) y se tiñeron con MPO conjugada con AF555 y Hoechst. El número de células positivas para MPO y tinción de cromatina (Hoechst) se consideraron productoras de NETs. Se cuantificó el porcentaje de NETs como el promedio de 6 campos, normalizado para el número total de células analizadas.

Análisis estadístico.

Las variables cuantitativas se expresaron mediante medianas e intervalo intercuartil. Se usó Chi cuadrada para determinar asociación entre variables nominales, U de Mann-Whitney para comparar medianas de muestras independientes y la prueba de Wilcoxon para medianas de muestras relacionadas. La correlación entre variables cuantitativas se realizó mediante la Rho de Spearman y para determinar los riesgos relativos con IC 95% para el desarrollo de infección, se llevó a cabo un análisis de regresión logística. Se tomó un valor de $P < 0.05$ para considerarse estadísticamente significativa. El análisis estadístico se llevó a cabo con los programas SPSS v 21 (IBM Corp. Armonk, NY, USA) y R (R Core Team).

Resultados.

Se analizaron las muestras sanguíneas de 22 pacientes del protocolo de profilaxis con trimetoprim sulfamatoxazol en paciente con lupus eritematosos generalizado con dosis mayores de 15 mg día de prednisona. La mediana de edad de los pacientes evaluados fue de 32.5 años (intervalo de 18-56 años), de los cuales 19 (86.3%) fueron mujeres con una duración promedio de la enfermedad de los paciente de 6.1 años. Al momento de la toma de muestra inicial para el estudio inmunológico los pacientes se encontraban con datos de actividad con un SLEDAI promedio de 11.5, cursando con las principales actividades a nivel renal (19), articular (12), mucocutánea (8) y hematológica (4). La mayoría de los pacientes cursaba con cifras elevadas de anti DNA (promedio 16) y niveles bajos de complemento principalmente C4 (promedio 14). En cuanto a los fármacos inmunosupresores utilizados por los pacientes el promedio de dosis de prednisona fue de 39 mg día, la mayoría se encontraba con tratamiento a base de antimaláricos (86.3%), 12 pacientes con micofenolato de mofetil (54.5%), 7 con uso de ciclofosfamida (31.8%), 2 pacientes con azatioprina (9%) y uno con tacrolimus (4%).

Características demográficas de los pacientes

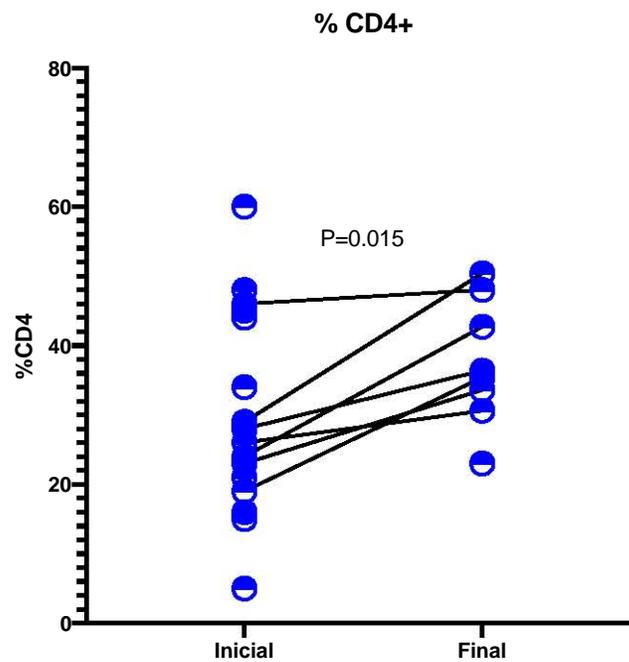
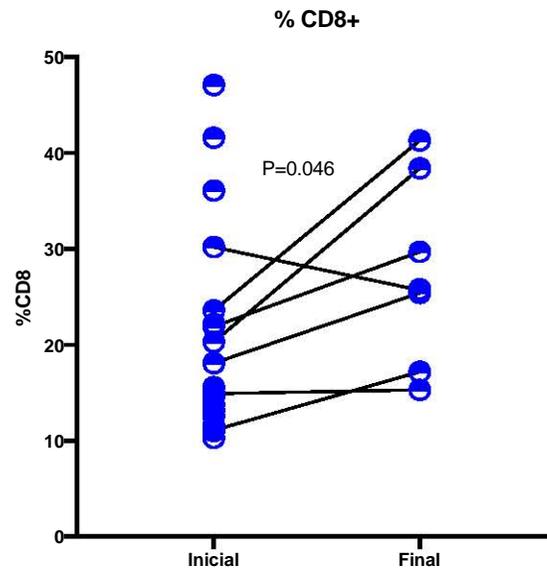
	N (%)
Edad, mediana (intervalo) años	32.2 (18-56)
Género femenino, n (%)	19 (86.3%)
Duración de la enfermedad, mediana (intervalo) años	6.1 años (0.08-21)
SLEDAI mediana (intervalo)	11.5 (2-24)
Comorbilidades	
Hipertensión arterial sistémica (n)	4
Diabetes mellitus tipo 2 (n)	1
Dislipidemia (n)	5
Hipotiroidismo (n)	2

Ninguna (n)	15
Tipo de actividad durante la evaluación	
Renal (n)	19
Serosos (n)	2
Hematológica (n)	4
Cardiaca (n)	0
Mucocutánea (n)	8
Articular (n)	12
Constitucional (n)	3
Complemento C3 bajo	14
Complemento C4 bajo	18
Anti DNA dc elevado	16
Proteína C reactiva	5
Tratamiento	
Prednisona dosis (mg)	39
Antimaláricos (n)	19
Ciclofosfamida (n)	7
Micofenolato de mofetil (n)	12
Azatioprina (n)	2
Tacrolimus (n)	1

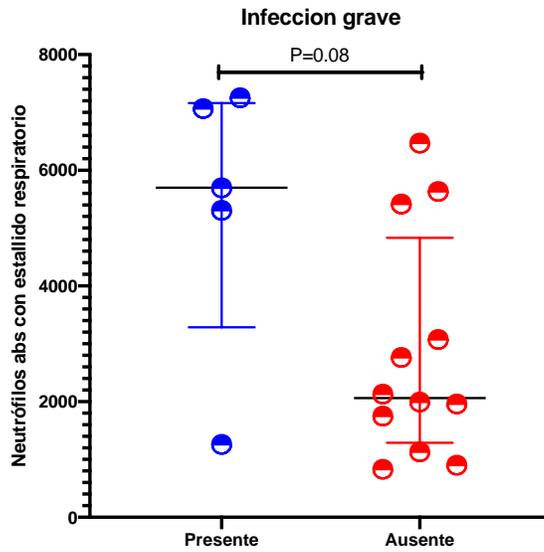
Durante el seguimiento de los pacientes evaluados solo un paciente presentó infección grave caracterizada por absceso faríngeo, por lo que el análisis estadístico se llevó a cabo comparando a los pacientes con infecciones, incluyendo graves y de repetición en comparación con aquellos sin antecedentes infecciosos. De igual forma se evaluaron los cambios en el inmunofenotipo y función de monocitos y neutrófilos cuando los pacientes se encontraban sin actividad de la enfermedad y con tratamiento a base de dosis bajas de esteroides.

Se encontraron los siguientes resultados:

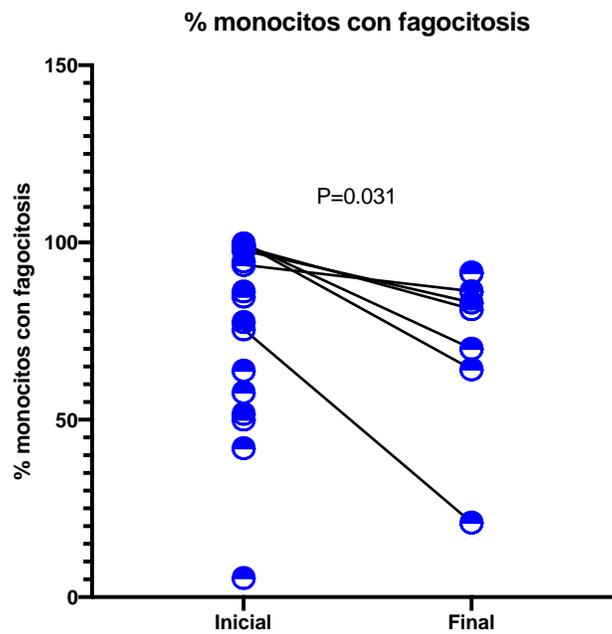
El porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ se incrementó cuando los pacientes se encontraron con actividad baja de la enfermedad y con dosis bajas de prednisona.



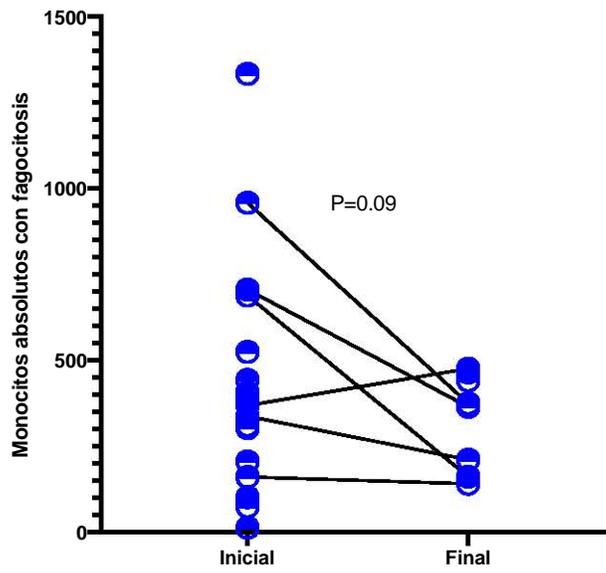
Los pacientes con mayor cantidad de LDG en los momentos de exacerbación de la enfermedad tienen mayor predisposición a infecciones.



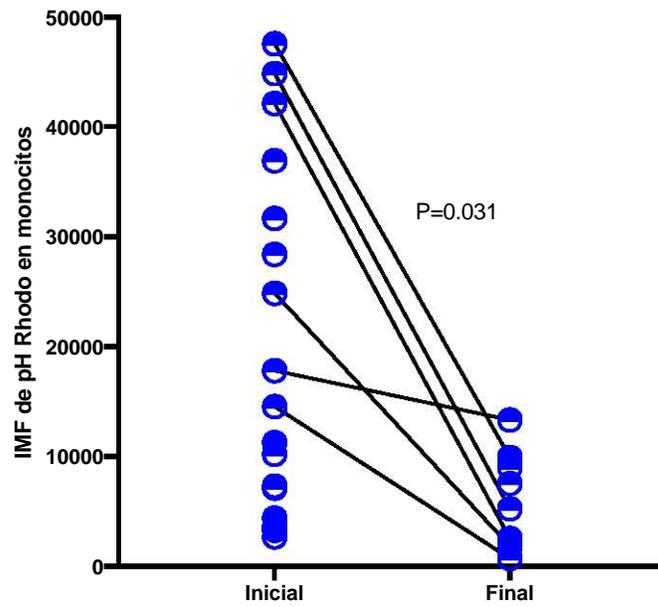
La fagocitosis en neutrófilos y monocitos disminuye al momento de alcanzar el periodo de respuesta clínica y al bajar la dosis de prednisona, con un p 0.031 para el porcentaje de monocitos con fagocitosis y p 0.09 para el número absoluto de monocitos con fagocitosis.

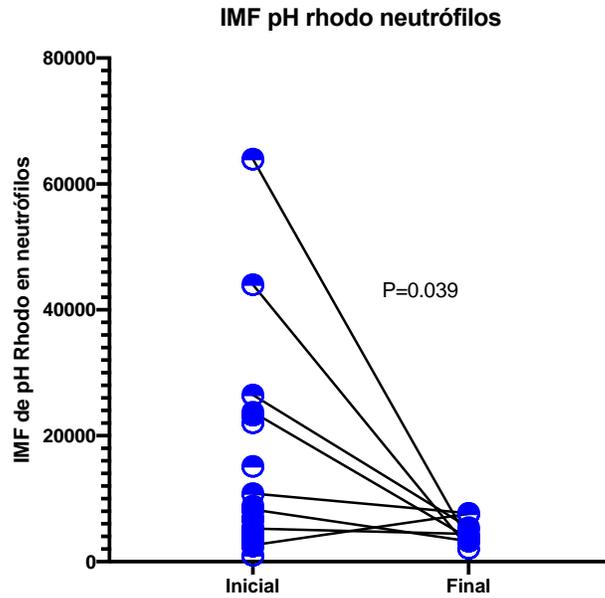


Monocitos absolutos con fagocitosis

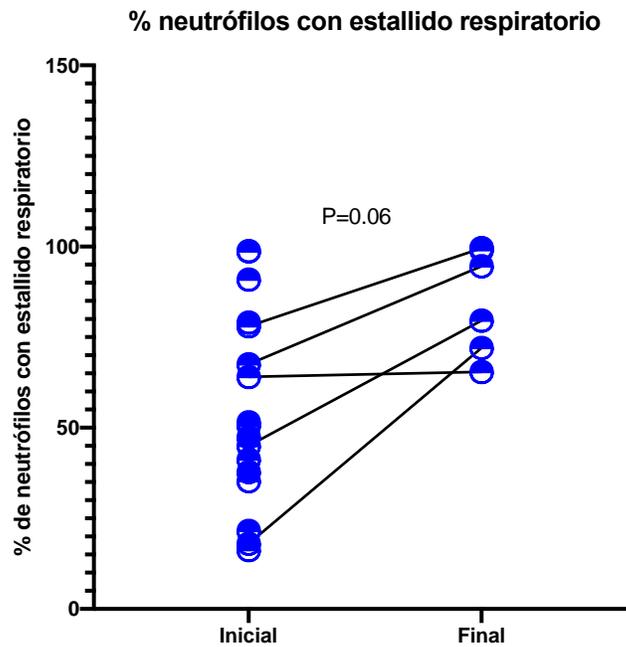


IMF pH rhodo monocitos



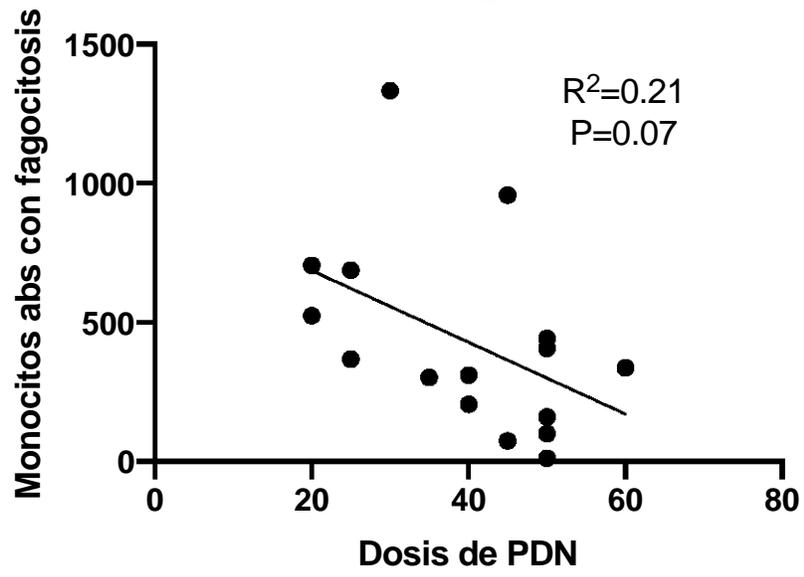


Hubo una tendencia al aumento del porcentaje de neutrófilos que presentan estallido respiratorio posterior a la respuesta clínica y al consumo de dosis bajas de esteroides.



Se encontró una correlación negativa débil entre la dosis de prednisona y los números absolutos de monocitos con fagocitosis con una p 0.07, R2 de 0.21.

PDN-Monos fagocitosis abs



Discusión.

Nuestro estudio valoró parámetros inmunológicos de 22 pacientes con lupus que participan en una cohorte para evaluar la eficacia del trimetoprim con sulfametoxazol como profilaxis de infecciones en pacientes con dosis de prednisona mayores a 15 mg día. Los parámetros que se evaluaron fueron: subpoblaciones de linfocitos, monocitos, LDGs, neutrófilos, así como la presencia de fagocitosis y estallido respiratorio. Las mediciones se realizaron primero durante una visita inicial (pacientes con dosis altas de prednisona) y segundo cuando el paciente se encontraba ya con dosis menores de 15 mg de prednisona. Se documentó el historial de infecciones graves y recurrentes en todos los pacientes para determinar si alguno de los parámetros inmunológicos medidos se asociaba a estas.

Los hallazgos más importantes de este estudio son que la fagocitosis aumenta durante periodos de actividad y que el incremento de granulocitos de baja densidad se relaciona con la predisposición a infecciones. De igual forma, los monocitos con fagocitosis muestran una correlación negativa débil con la dosis de prednisona y el porcentaje de neutrófilos que llevan a cabo estallido respiratorio aumenta durante la enfermedad inactiva y con dosis bajas de esteroides.

Los estudios de fagocitosis en monocitos y neutrófilos de pacientes con LEG han sido discordantes. En unos se ha observado disminución en la captación de cuerpos apoptóticos (probablemente en relación a menor expresión de CD14), menor secreción de TNF y anticuerpos anti receptores de Fc γ , que puede disminuir la fagocitosis [22, 23]. Dichos hallazgos se han replicado inclusive en mujeres embarazadas [24]. Otros han demostrado disminución en fagocitosis y expresión de CD11b en neutrófilos y monocitos de pacientes con LEG con MEX-SLEDAI >3 y consumo de menos de 15 mg de PDN por día así como pacientes con enfermedad inactiva en tratamiento con menos de 7.5 mg/d en comparación con controles [25]. Además, hubo una tendencia a la disminución de estallido respiratorio en pacientes con LEG independientemente del grado de actividad y tratamiento [25]. Dichos hallazgos fueron corroborados en pacientes con LEG pero con dosis bajas de PDN [26]. La disminución en la

fagocitosis fue independiente del tratamiento inmunosupresor [27]. En estudios de lupus pediátrico, no se ha demostrado una diferencia en la fagocitosis de bacterias durante el momento de infección ni con controles sanos [28]. De igual forma, la fagocitosis de Salmonella se encontró disminuida en sujetos con LEG de inicio juvenil de manera independiente de la actividad de la enfermedad y sin relación con tratamiento inmunosupresor [28]. Uno de los factores implicados en la disminución de la fagocitosis ha sido la positividad para anticuerpos anti La [27].

Con respecto a la relación entre la administración de esteroides y la fagocitosis, estudios previos demostraron que la eliminación bacteriana en pacientes con LEG aumenta posterior a la administración de un gramo de metilprednisolona (MTP) en pacientes con LEG [29]. Nuestros resultados son concordantes con el aumento de la fagocitosis posterior a la administración de esteroides, ya que durante el consumo de dosis altas de esteroides, se observó aumento de la fagocitosis en monocitos y neutrófilos.

Como previamente fue descrito, los pacientes con aumento de LDG durante la enfermedad activa tienen aumento en la predisposición a infecciones [30]. Los pacientes con LEG tienen granulocitos de baja densidad dentro de sus células mononucleares, que son neutrófilos caracterizados por la alta expresión de CD15, la baja expresión de CD14, CD10 y CD16 sin expresar MHC clase II y CD86 y que bajo estimulación producen TNF e interferones tipo I y II [15] además de que expresan mayor cantidad de LL-37, elastasa, MPO y catepsina G y tienen una menor fagocitosis [15]. Estas células llevan a cabo NETosis de manera espontánea y se encuentran presentes en pacientes con actividad articular, renal y vasculitis [15]. La mayor predisposición a formar NETs y menor fagocitosis en estas células podría ser la explicación de su relación con infecciones y actividad de la enfermedad en pacientes con LEG.

Nosotros tampoco encontramos un papel importante de la dosis de esteroides en el estallido respiratorio, solo encontrando alteraciones en la fagocitosis relacionadas con la dosis de prednisona, apoyando resultados de estudios previos más recientes como el de Bengtsson et al

donde encontraron que la producción de ERO de los paciente con LEG (n=92) no se asoció con la dosis de corticoesteroides u otras inmunoterapias concluyendo que los PMN en pacientes con LEG tienen una función alterada, están parcialmente activados y se liberan anómalamente en médula ósea [31].

La principal perspectiva de este estudio será analizar si la NETosis se relaciona con la predisposición a infecciones en pacientes con LEG y si hay diferencias con respecto al tratamiento profiláctico con antibiótico, ya que en otros sujetos como aquellos con ERCT se ha observado disminución de la fagocitosis en PMN y ésta se puede restaurar mediante el uso de amoxi-clav [32]

Conclusiones.

En pacientes con LEG, hay un aumento en la fagocitosis durante episodios de actividad de la enfermedad en la que se administran dosis altas de esteroides. Los parámetros de fagocitosis y estallido respiratorio no se relacionaron con el desarrollo de infección.

Bibliografía.

1. Kaul A, Gordon C, Crow MK, Touma Z, Urowitz MB, van Vollenhoven R, Ruiz-Irastorza G, Hughes G. Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Jun 16;2:16039
2. Ruiz-Irastorza G, Olivares N, Ruiz-Arruza I, Martinez-Berriotxo A, Egurbide MV, Aguirre C. Predictors of major infections in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(4):R109.
3. Ju-Yang Jung and Chang-Hee Suh. Infection in systemic lupus erythematosus, similarities, and differences with lupus flare. *Korean J Intern Med*. 2017 May; 32(3): 429–438.
4. Jeong SJ, Choi H, Lee HS, Han SH, Chin BS, Baek JH, Kim CO, Choi JY, Song YG, Kim JM. Incidence and risk factors of infection in a single cohort of 110 adults with systemic lupus erythematosus. *Scand J Infect Dis*. 2009;41(4):268-74
5. Yang SC, Lai YY, Huang MC, Tsai CS, Wang JL. Corticosteroid dose and the risk of opportunistic infection in a national systemic lupus erythematosus cohort. *Lupus*. 2018 Oct;27(11):1819-1827.
6. Youssef J, Novosad S, Winthrop KL. Infection Risk and Safety of Corticosteroid Use. *Rheum Dis Clin North Am*. 2016 Feb;42(1):157-76
7. Chew LC, Maceda-Galang LM, Tan YK, Chakraborty B, Thumboo J. Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with autoimmune disease on high-dose glucocorticoid. *J Clin Rheumatol*. 2015 Mar;21(2):72-5
8. Ogawa J, Harigai M, Nagasaka K, et al. Prediction of and prophylaxis against Pneumocystis pneumonia in patients with connective tissue diseases undergoing medium- or high-dose corticosteroid therapy. *Mod Rheumatol* 2005;15:91–6
9. Vananuvat P, Suwannalai P, Sungkanuparph S. Primary prophylaxis for Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with connective tissue diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 2011 Dec;41(3):497-502.
10. Park JW, Curtis JR, Moon J, Song YW, Kim S, Lee EB. Prophylactic effect of trimethoprim-sulfamethoxazole for pneumocystis pneumonia in patients with rheumatic diseases exposed to prolonged high-dose glucocorticoids. *Ann Rheum Dis*. 2018 May; 77(5):644-649.
11. Andreas Kronbichler, Julia Kerschbaum, Seerapani Gopaluni, Joanna Tieu, Federico Alberici, Rachel Bronwen Jones, Rona M Smith, David R W Jayne, Trimethoprim–sulfamethoxazole prophylaxis prevents severe/life-threatening infections following rituximab in antineutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis*. 2018 Oct; 77(10): 1440–1447
12. Masako Utsunomiya, Hiroaki Dobashi, Toshio Odani, Kazuyoshi Saito, Naoto Yokogawa, Kenji Nagasaka, Kenchi Takenaka. Optimal regimens of sulfamethoxazole-trimethoprim for

chemoprophylaxis of *Pneumocystis pneumonia* in patients with systemic rheumatic diseases: results from a non-blinded, randomized controlled trial. *Arthritis Research & Therapy* 2017.

13. Li Y, Lee PY, Reeves WH. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010;58(5):355-64.

14. Mariana J Kaplan. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther.* 2013; 15(5): 219.

15. Kaplan MJ. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Sep 27;7(12):691-9.

16. Vaishali R. Moulton, Abel Suarez-Fueyo, Esra Meidan, Hao Li, et al. Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends Mol Med.* 2017 Jul; 23(7): 615–

17. Biermann MHC, Boeltz S, Pieterse E, Knopf J. Autoantibodies Recognizing Secondary Necrotic Cells Promote Neutrophilic Phagocytosis and Identify Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2018 May 7;9:989.

18. Breitenbach M, Rinnerthaler M, Weber M, et al. The defense and signaling role of NADPH oxidases in eukaryotic cells : Review. *Wien Med Wochenschr.* 2018 Sep;168(11-12):286-299.

19. Bylund J, Brown KL, Movitz C, et al. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for?. *Free Radic Biol Med.* 2010 Dec 15;49(12):1834-45. 23(5):375-405.

20. DeLeo FR, Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol* 1996;60(6):677-91.

21. Campbell AM1, Kashgarian M, Shlomchik MJ. NADPH oxidase inhibits the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2012 Oct 24;4(157):157ra141

22. Iliopoulos Ag Tsokos GC. Immunopathogenesis and Spectrum of Infections in Systemic Lupus Erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1996;25(5):19.

23. Byrne J. C., Ni Gabhann J., Lazzari E., et al. Genetics of SLE: functional relevance for monocytes/macrophages in disease. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:582352.

24. Sukhikh G. T., Safronova V. G., Vanko L. V., et al. Phagocyte activity in the peripheral blood of pregnant women with systemic lupus erythematosus and in the cord blood of their newborns. *Int J Rheum Dis* 2017;20(5):597-608.

25. De La Fuente H., Richaud-Patin Y., Jakez-Ocampo J., Gonzalez-Amaro R., Llorente L. Innate immune mechanisms in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *Immunol Lett* 2001;77(3):175-80.

26. Bengtsson A. A., Pettersson A., Wichert S., et al. Low production of reactive oxygen species in granulocytes is associated with organ damage in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2014;16(3):R120.

27. Biswas D., Mathias A., Dayal R., Aggarwal A., Misra R., Naik S. Presence of antibodies to SSB/La is associated with decreased phagocytic efficiency of neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2008;27(6):717-22.
28. Wu S. A., Yeh K. W., Lee W. I., et al. Impaired phagocytosis and susceptibility to infection in pediatric-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2013;22(3):279-88.
29. S. H. Boghossian, D. A. Isenberg, G. Wright. Effect of high-dose methylprednisolone therapy on phagocyte function in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1984, 43, 541-550
30. Torres-Ruiz J., Mejia-Dominguez N. R., Zentella-Dehesa A., et al. The Systemic Lupus Erythematosus Infection Predictive Index (LIPI): A Clinical-Immunological Tool to Predict Infections in Lupus Patients. *Front Immunol* 2018;9:3144.
31. Anders A Bengtsson Åsa Pettersson, Stina Wichert, Birgitta Gullstrand, et al. Low production of reactive oxygen species in granulocytes is associated with organ damage in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16(3): R120
32. Cuffini A. M., Tullio V., Giacchino F., et al. Impact of co-amoxiclav on polymorphonuclear granulocytes from chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001;37(6):1253-9.