



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"**

**"PAPEL DE LA RESPUESTA TH1 Y TH17 EN LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD
HUMANA POR APLICACIÓN DE SUBSTANCIAS MODELANTES"**

**MODALIDAD DE GRADUACIÓN: TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS**

**PRESENTA:
GABRIEL MEDRANO RAMIREZ**

**TUTOR:
DRA. ROSA MARIA WONG CHEW
JEFA DE LA SUBDIVISION DE INVESTIGACION CLINICA, FACULTAD DE
MEDICINA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DEL 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD**

TESIS DE POSGRADO

**“PAPEL DE LA RESPUESTA Th1 Y Th17 EN LOS PACIENTES CON
ENFERMEDAD HUMANA POR APLICACIÓN DE SUBSTANCIAS
MODELANTES”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

GABRIEL MEDRANO RAMIREZ

**TUTOR DE TESIS:
DRA. EN C. ROSA MARIA WONG CHEW**

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi esposa y a mi hija, por haber entendido y sacrificado tiempo valioso para que pudiera llevar a cabo esta maestría apoyándome e impulsándome en todo momento, siendo ellas la fuerza y motivación que me ayudó a terminar este proyecto.

A mi tutora y amiga, la Dra. Rosa María Wong Chew por aceptar guiarme en este proyecto, quién me brindó orientación, apoyo y asesoría para llevar a cabo mi trabajo de maestría.

Al Doctor en ciencias Miguel Leonardo García León por su apoyo, asesoría técnica y conocimientos, pues sin estos no hubiese podido desarrollar las habilidades requeridas dentro del laboratorio.

A mi maestro el Dr. Rubén Burgos Vargas por su apoyo y confianza.

A mis sinodales y revisores de tesis de mi examen de grado por su atención, tiempo, disposición, aportaciones y apoyo brindado para que este trabajo pudiera ser culminado.

INDICE

Capítulo I	RESUMEN	5-8
Capítulo II	INTRODUCCIÓN	9
	Antecedentes	9
	Planteamiento del problema	16
	Pregunta de investigación	16
	Hipótesis	16
	Objetivos	17
Capítulo III	METODOLOGÍA	17
Capítulo IV	RESULTADOS	24
Capítulo V	ANÁLISIS DE LOS DATOS	
	Discusión	35
	Conclusiones	39
Capítulo VI	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
Capítulo VII	ANEXOS	45

RESUMEN

Introducción: La enfermedad humana por aplicación de sustancias modelantes (EHM) es un proceso inflamatorio caracterizado por diversas manifestaciones clínicas, ocasionado por la infiltración de diversas sustancias con fines modelantes. En 1994 se identificó la producción intracelular de IL-1 en pacientes con este tipo de padecimiento. Sin embargo, la respuesta inmune no está bien caracterizada. No hay un tratamiento específico para esta enfermedad, debido a que no se conoce el mecanismo patogénico; el conocer este permitirá diseñar estrategias efectivas para el tratamiento.

Objetivo: Caracterizar la respuesta inmune tipo Th1, Th2, y Th17 que presentan los pacientes con manifestaciones inflamatorias y autoinmunes con EHM.

Material y métodos: Se realizó un estudio observacional, descriptivo, transversal, comparativo, prolectivo.

Se incluyeron 52 pacientes con infiltración de sustancias modelantes, categorizados en: a) inflamados y b) no inflamados, se registró el tipo de sustancia infiltrada, manifestaciones clínicas, tiempo de evolución, se tomaron muestras de laboratorio generales. Se evaluó el porcentaje de linfocitos con un fenotipo Th17 utilizando marcadores de superficie celular contra: TCD3+ (AlexaFluor 488), TCD4+ (PECy7) , CD161+ (APC) y CD196+ (PE) y el patrón de citocinas mediante el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/TH17 cytokine kit (Becton Dickinson) utilizando citometría de flujo. Se utilizó Chi² o prueba exacta de Fisher, y t de Student, o U de Mann Whitney, para la correlación se realizó regresión logística.

Resultados: Se evaluaron a un total de 52 pacientes, de los cuales 46 (88.4%) fueron del género femenino y 6 (11.5%) del género masculino, categorizados en no inflamados (44.23%) del género femenino y 7.69% masculinos, inflamados 44.23% del género femenino y 3.84% masculinos. La mayor proporción de sustancias infiltradas correspondió a aceites $p < 0.05$, la zona más frecuentemente infiltrada fueron las nalgas 80.7%. Las nodulaciones fueron las manifestaciones clínicas más frecuente en el 57.9% de los casos. En el patrón de citocinas no se encontraron

diferencias para TNF α entre el grupo no inflamado 492.31 ± 795.95 vs inflamado 668.00 ± 1059.10 IC 95% (-700.85 – 349.46) $p= 0.530$; para el fenotipo Th1 solo se encontraron diferencias significativas en IL-1 β en los no inflamados 2374.5 ± 4776.90 vs inflamados 680.27 ± 1128.31 IC 95% (-539.24 – 3927.72) $p=0.023$; y para IFN γ en los no inflamados 1348.03 ± 4346.79 vs inflamados 332.48 ± 627.46 IC 95% (-682.19 – 2713.28)($p=0.029$). La IL-2 no mostró diferencias significativas entre ambos grupos. En el fenotipo Th2 las diferencias significativas fueron para la IL-5 en el grupo de los no inflamados 15.32 ± 34.66 vs inflamados 4.35 ± 14.55 IC 95% (-6.28 – 28.24)($p=0.005$), para IL-6 en los no inflamados 9258.25 ± 15280.75 vs inflamados 4682.87 ± 5565.89 IC 95% (-1736.53 – 10887.29) $p= 0.006$; para IL-10 en el grupo de los no inflamados 118.06 ± 263.53 vs inflamados 82.70 ± 251.27 IC 95% (-108.04 – 178.76)($p=0.301$).En el fenotipo Th 17, la IL 17 no demostró diferencias significativas entre ambos grupos, no inflamados 78.42 ± 172.13 vs inflamados 95.63 ± 223.34 IC 95% (-129.74 – 95.30) ($p=0.461$), en el fenotipo Th 17 aunque no fue significativo, se observó una tendencia mayor en el grupo de inflamados $0.1499 \pm .14$ IC 95% (-.56 – 1.45) vs no inflamados 0.059 ± 1.79 vs inflamados . $p=0.071$

Conclusiones: En el grupo de pacientes con inflamación se observó una mayor tendencia a presentar un fenotipo Th17, así como una disminución en la respuesta Th1 e IL-10, lo que sugiere una respuesta celular previa ya controlada. En el grupo de pacientes no inflamados se presentó un patrón de respuesta combinada Th1 (IL-1 β , IFN γ)/Th2 (IL-5, IL-6, IL-13) con una mayor concentración de IL-10 comparado con el grupo de inflamados, lo que sugiere un proceso inflamatorio que es controlado por el incremento de IL-10 que probablemente este incremento explique la ausencia de manifestaciones clínicas en éste grupo.

Palabras clave: enfermedad humana por sustancias modelantes, fenotipo Th 17, citocinas.

ABSTRACT

Background: Modeling human disease is an artificial disease, that produce inflammation of different degrees, including sometimes autoimmune diseases, pathogenic aspects are partially described, the identification of the lymphocyte phenotype could help to understand the disease.

Specific aim: To characterize the Th1, Th2 and Th17 immune responses and clinical characteristics in patients with inflammatory and autoimmune disease injected with modeling substances.

Methods: An observational, descriptive, transversal, comparative, prolective study was performed. 52 patients with infiltration of modeling substances, naive to any treatment were included. They were categorized in two groups: a) with Inflammation and b) without inflammation. The infiltrated substance type, clinical manifestation, and evolution time were registered, blood samples were taken. The percentage of lymphocytes with Th17phenotype was assessed using TCD3+ (AlexaFluor 488), TCD4+ (PECy7), CD161+ (APC) and CD196+ (PE) monoclonal antibodies and analyzed by flow cytometry with the FacsCanto-II. Data were analyzed with FacsDiva software. A descriptive analysis with measures of central tendency, comparative analysis of interleukin levels in both population, a correlation of clinical variables and cytokine pattern was performed, chi square and Fisher exact test were used for qualitative variables and for quantitative variables with normal distribution Student t, or with non-normal distribution Mann-Whitney U test, for correlation logistic regression was performed.

Results: 52 patients were included, 46 (80.7%) female and 6 (10.5%) males, categorized in not swollen (44.2%) female and 7.6% males, and swollen 44.2% female and 3.84% males. The largest proportion of infiltrated substance corresponded to oil $p < 0.05$, the most frequently infiltrated area were the buttocks (80.7%). The nodules were the most frequent clinical manifestation in 57.9% of the cases. In the assessment of cytokines in both groups, we found no differences for TNF α a proinflammatory cytokine between the not swollen 492.31 ± 795.95 and the swollen group 668.00 ± 1059.10 IC 95% (-700.85 – 349.46) $p = 0.530$; for the Th1 phenotype we found significant differences only in IL-1 β between the not swollen 2374.5 ± 4776.90 vs the

swollen group 680.27 ± 1128.31 IC 95% (-539.24 – 3927.72) $p=0.023$; and for IFN γ in the not swollen 1348.03 ± 4346.79 vs the swollen group 332.48 ± 627.46 IC 95% (-682.19 – 2713.28)($p=0.029$), IL-2 showed no differences between the groups. For the Th2 phenotype there were significant differences for IL-5 in the not swollen group 15.32 ± 34.66 compared to the swollen group 4.35 ± 14.55 IC 95% (-6.28 – 28.24)($p=0.005$), for IL-6 in the not swollen 9258.25 ± 15280.75 vs the swollen group 4682.87 ± 5565.89 IC 95% (-1736.53 – 10887.29) $p=0.006$; for IL-10 in the not swollen group 118.06 ± 263.53 vs the swollen group 82.70 ± 251.27 IC 95% (-108.04 – 178.76)($p=0.301$). For the Th17 phenotype, IL 17 showed no significant differences between both groups , not swollen 78.42 ± 172.13 vs swollen 95.63 ± 223.34 IC 95% (-129.74 – 95.30)($p=0.461$), for the Th17 phenotype a trend towards the swollen group was observed with $0.14 \pm .1499$ IC 95% (-.560 – 1.45) not swollen 0.05 ± 1.796 $p=0.07$.

Conclusion: There was no significant difference between both groups in regards to pro-inflammatory phenotype, there were differences in the Th1 phenotype (IL-1 β , e IFN γ), in the Th2 phenotype there were differences in IL-5, 6 and IL-10, this could be explained as an inflammatory phenomenon that will be wasting over time, with an IL-10 decreasing the inflammatory phenomenon in the not swollen group. For the phenotype despite there is no significant difference, there is a trend for the Th17 phenotype in the swollen group; this could be explained by a small sample size.

Keywords: Human modeling disease, phenotype Th 17, cytokines

INTRODUCCIÓN

Antecedentes históricos

La aplicación de sustancias con fines modelantes data de finales del siglo XIX, cuando se utilizaban prótesis de parafina con fines médicos para pacientes con labio y paladar hendido así como su uso en pacientes orquiectomizados, las complicaciones tardías locales y a distancia fueron observadas a través de los años y presentadas como series de casos en diversos congresos para cirujanos en Europa a principios del siglo XX. Sin embargo su uso ha continuado, y en el transcurso de los años se ha agregado otra sustancia: el silicón. La descripción histológica de las complicaciones a nivel local tras el uso de estas sustancias fueron parafinoma y silicoma respectivamente¹

Hasta antes de la década de los 60, la aplicación de parafina y silicón en Europa y Estados Unidos así como Sakurai (combinación de ácidos grasos y aceite de oliva) en Japón eran unas de las técnicas más empleadas con fines estéticos. Desafortunadamente, su uso se asoció a una serie de problemas de salud (embolia grasa, hepatitis granulomatosa, neumopatía intersticial) que llevaron a la muerte a muchas personas²

En 1964, Miyoshi et al, realizó la primera descripción de una enfermedad del tejido conectivo asociada a la inyección de parafina o silicón ^{3,4,5}

En 1960, la Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos prohibió el uso de silicón y parafina con fines estéticos. Así, en los países desarrollados el uso de estas sustancias disminuyó en forma simultánea con el auge en el desarrollo y uso a gran escala de las prótesis de silicón^{6,7,8,9}.

En México, y probablemente en muchos países en desarrollo, la aplicación de sustancias como el silicón, la parafina, diversos aceites y otro tipo de sustancias solas o combinadas continúa siendo una de las técnicas más frecuentemente utilizadas para mejorar el aspecto físico de las personas. El costo mucho menor de una infiltración en comparación a una cirugía estética hace que este procedimientos modelantes se realicen indiscriminadamente ya sea en consultorios, gimnasios, salones de belleza o inclusive en el domicilio particular de personas que no son médicos. Fuera de notas

periodísticas, las publicaciones científicas acerca de este problema son muy escasas. Debido a esto llevamos a cabo una revisión exhaustiva de los casos atendidos en los últimos años en los pacientes atendidos en el servicio de Reumatología del Hospital General de México y CLIDITER(Clínica para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades reumáticas), con el propósito de describir las características clínicas de lo que ahora se conoce como enfermedad humana por adyuvantes o por aplicación de sustancias modelantes¹⁰.

La enfermedad humana por aplicación de sustancias modelantes (por adyuvantes):

La enfermedad humana por adyuvantes o por aplicación de sustancias modelantes (EHM), es una práctica prohibida desde 1960 por la FDA debido a sus consecuencias potencialmente catastróficas. Esta entidad se caracteriza por un espectro de manifestaciones clínicas previamente definidas en un estudio del servicio de reumatología y cirugía plástica del Hospital General de México. Estas manifestaciones son: formación de nodulaciones (65%), hiperemia local (70%), hipercromía (58%), endurecimiento cutáneo (55%), dolor local (62%), várices locales (38%), inflamación (50%), artralgiás (30%), artritis (5%), fiebre (40%). El problema estriba en que no hay estadísticas de la prevalencia e incidencia de esta enfermedad, en general los datos han sido obtenidos en base a estudios descriptivos con un número de pacientes muy variable¹⁰, y la gravedad de esta patología ha sido clasificada teniendo una utilidad pronóstica¹¹. El fenotipo de esta enfermedad está influenciado por las características de la sustancia¹².

La EHM en México es un problema de salud pública ya que la práctica ilícita de este procedimiento continúa de manera clandestina y la desinformación o mala información de una gran parte de la población favorece a que esta práctica continúe. El tratamiento quirúrgico parecería ser el estándar de oro. Sin embargo, la migración de la sustancia por gravedad, por vía linfática y por vía hematogéna^{13,14,15,16} hacen de esta condición un problema incurable ocasionando manifestaciones a distancia y perpetuando la respuesta inflamatoria^{17,18}

De manera interesante, la mayoría de las personas que han sido infiltradas pueden o no presentar una respuesta inflamatoria de características variables en un periodo de tiempo, algunos otros pacientes han desarrollado enfermedades autoinmunes en el 9-83% de los casos (causalidad aún no determinada)^{19,20,21,22,23} y otros no han desarrollado respuesta inflamatoria.

Hoy sabemos, que en la EHM, la gama de manifestaciones clínicas es múltiple, y son explicadas por reacciones locales, o a distancia por migración de la sustancia por vía hematogena y/o linfática, ocasionando manifestaciones sistémicas de distinta magnitud.

A nivel histológico se han descrito diversas alteraciones, como la reacción granulomatosa (Tipo IV) caracterizada por una fase aguda: en la que se encuentra infiltración predominantemente por polimorfonucleares, y una fase crónica: caracterizada por una infiltración de linfocitos, fibroblastos y células plasmáticas.^{24,25}

Las complicaciones sistémicas son más difíciles de explicar, pero la evidencia acumulada en los últimos años apoya la idea de que el silicón puede operar a través de un mecanismo adyuvante mediando la liberación de citocinas proinflamatorias (específicamente IL-1)²⁴. Se entiende por adyuvante a aquella sustancia que incrementa la respuesta inmune antígeno-específica²⁶. El efecto adyuvante está acompañado de una serie de mecanismos que implican a la inmunidad innata como a la inmunidad adaptativa^{27,28}.

Existe un incremento en la actividad de las células dendríticas, linfocitos, macrófagos y actividad intracelular del sistema del inflamosoma (Nalp3)²⁶. Estos adyuvantes incrementan la reacción local a antígenos y consecuentemente la liberación de quimiocinas y citocinas de las células T cooperadoras y células cebadas^{29,30}. Actualmente existen diversos adyuvantes, algunos utilizados en medicina para modelos experimentales para inducción de respuestas inflamatorias o bien ciertas sustancias como partículas de aluminio, silicón, lipopolisacáridos³¹ o bien las diversas sustancias infiltradas por las personas con fines modelantes (como en nuestra población de estudio). El efecto adyuvante contribuye a la inducción y activación de células T cooperadoras (Th2) así como la producción de IL-4³². En modelos animales

se ha identificado la capacidad de estos adyuvantes para producir inflamación, y si el estímulo persiste podrá ocasionar una enfermedad autoinmune.³³

La respuesta inflamatoria ocasionada en esta entidad está mediada por dos tipos de linfocitos los B y los T. La respuesta Th1 conduce principalmente a una respuesta celular que tiene como finalidad proteger contra patógenos intracelulares. Las células Th1 secretan IFN gama que activa a los macrófagos para llevar a cabo el estallido respiratorio mediado por lisis del patógeno, los linfocitos T citotóxicos inducen la muerte de las células infectadas mediante la secreción de granzimas y perforinas. Por otro lado, las células Th2 inducen la respuesta humoral que es importante para la defensa de patógenos extracelulares, estas células Th2 secretan citocinas que incluyen IL4 la cual promueve la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, favoreciendo la secreción de anticuerpos neutralizantes. Y de manera relevante la respuesta celular Th17, que es esencial en la inflamación a través de la activación de neutrófilos y fibroblastos vía IL 17/23³⁴ y que está relacionada con fenómenos inflamatorios y enfermedades autoinmunes.

En la actualidad se entiende como EHM a las manifestaciones clínicas y de laboratorio de autoinmunidad caracterizadas por un proceso inflamatorio agudo y crónico que puede conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes, así como alteraciones de tipo granulomatoso a cuerpo extraño que son desencadenadas por la aplicación de sustancias químicas con fines estéticos y que mejora al retirarlas. Recientemente esta patología ha sido incluida dentro de un síndrome conocido como ASIA (Autoimmune / inflammatory Syndrome induced by adjuvants)³⁵

Las células Th17 en la enfermedad autoinmune

El sistema inmune a través de la inmunidad innata y adaptativa es el encargado de defender al organismo de cualquier tipo de agresión que puede afectar a las células o los tejidos, el proceso de la respuesta adaptativa consta de 6 fases : 1)Reconocimiento del antígeno extraño, 2)Identificación, activación y expansión de linfocitos con moléculas que reconocen específicamente ese antígeno, dando lugar a clonas antígeno-específicas, 3)Diferenciación de las células en reposo a células con fenotipo efector, 4)Desarrollo de la respuesta propiamente dicha: las células o sus productos

inactivan y eliminan a los patógenos. 5) Contracción de las células efectoras una vez resuelta la situación 6) Memoria inmunológica.

Hasta 1970, los linfocitos T fueron las primeras células descritas encargadas de la coordinación de la respuesta inmune. Fueron clasificados como linfocitos T cooperadores y citotóxicos. En los años 80's creció el conocimiento de la funcionalidad de los linfocitos T y se identificaron dos tipos de respuesta cooperadoras: la Th1 (inmunidad celular o retardada) y la Th2 (inmunidad humoral), esta división se fundamentó en el patrón de citocinas que eran capaces de secretar una vez activadas. A partir de aquí se denominó Th1 a los linfocitos secretores de interferón gama e IL-2, y Th2 a los que secretaban IL-4 e IL-13. Hay un tercer tipo de células cooperadoras denominadas Th3, las cuales suprimen la respuesta inmune mediante la producción de TGF β ³⁶.

La clasificación de células cooperadoras fue revisada recientemente identificando una nueva familia de IL-17A – F y sus funciones efectoras, tras identificar a un tipo distinto de linfocitos T (CD4+) que secretan IL-17 y que coordinan la respuesta inmune de un modo distinto a las Th1 o a las Th2³⁷. A estas células se les denominó Th17. El ambiente de citocinas como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) e IL-6 inducen la generación de estas células dependiendo de los estímulos recibidos y no solo producen IL-17 sino IL-23.

La relevancia de estas células es que independientemente que tienen un papel para combatir bacterias y hongos se ha descrito un efecto pro-inflamatorio que puede ser el puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Las citocinas implicadas en el control de la actividad Th17 son la IL-23, el TGF- β y la IL-6 las cuales promueven la diferenciación de los linfocitos quiescentes en TH17.

Aunque este tipo de células se han descubierto recientemente, su hiperfunción se ha asociado a procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes promovidos por el efecto proinflamatorio de IL-17. Es así que la IL-17 se ha implicado en el desarrollo directo de enfermedades autoinmunes.^{38,39}

Algunos de los productos (citocinas) de las células Th17 han sido encontrados en altas cantidades en tejidos humanos afectados por enfermedades autoinmunes y sus

respectivos modelos murinos⁴⁰. Los productos de las células Th 17 como IL-17 e IL-23 se han encontrado en el suero y en el líquido sinovial de la mayoría de los pacientes con artritis reumatoide, mientras esto no ha sido demostrado en pacientes con osteoartritis.^{40,41,42,43}

Otros estudios en otras enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal también han demostrado altos niveles de IL-17 y otras citocinas relacionadas a estas vías en suero y tejidos⁴⁴.

Se ha documentado que las células T de sangre periférica de los pacientes con artritis reumatoide co-incubadas con fibroblastos sinoviales en presencia de colágena tipo II inducen la producción de IL-15, TNF α e IL-18 por las células sinoviales, en cambio las células T producen altas cantidades de IL-17 e IFN α en respuesta a estas citocinas⁴⁵.

La IL-17 también estimula e incrementa la producción de IL-6 e IL-8, promueve la destrucción del cartílago, inhibe la síntesis de colágena e induce la reabsorción ósea en pacientes con artritis reumatoide, e incrementan la expresión de genes para citocinas y metaloproteinasas. Estas células participan en la perpetuación de la inflamación articular como un socio dinámico basado en una activación mutua establecido por una retroalimentación vía secreción de citocinas y quimoquinas estimulando una a la otra⁴⁶.

Se sabe que los pacientes con estadios iniciales de eventos inflamatorios articulares que progresan a artritis reumatoide tienen un perfil transicional de citocinas caracterizado por la producción de IL-2, IL-4, IL-13, IL-17 e IL-15 en líquido sinovial. De manera interesante este perfil de citocinas Th2 /Th17 no ha sido visto en fases avanzadas de la enfermedad⁴⁷.

Otros estudios en otras enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal también han demostrado altos niveles de IL-17 y otras citocinas relacionadas a estas vías en suero y en tejidos.⁴⁸

Se ha descrito que diversas patologías de base autoinmune se deben a disregulación de las células cooperadoras, de esta manera el exceso de señales que generan los linfocitos Th1 se asocian a procesos inflamatorios, mientras que el exceso de señales Th2 desencadena enfermedad atópica⁴⁹. El descubrimiento de las células Th 17 ha

demostrado que su hiperfunción se asocia a procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes promovidos específicamente por el efecto proinflamatorio de la IL-17.⁵⁰

Con anterioridad se consideraba que los principales causantes de daño tisular en las enfermedades autoinmunes eran las células Th1. Sin embargo, hoy en día se conoce que las Th 17 son las principales inductoras de enfermedad autoinmune, migran más rápidamente que las células Th1 a las zonas de lesión, median la respuesta inflamatoria, siendo capaces de reclutar a otras células complementarias, entre estas las células Th1 que necesariamente deben de colaborar con las Th17 para que se produzca inflamación y destrucción tisular⁵¹

La inflamación es un proceso patológico caracterizado por lesión o destrucción de los tejidos causado por una variedad de reacciones químicas y citológicas. Habitualmente se manifiesta por signos típicos de dolor, calor, enrojecimiento, inflamación y pérdida de la función.

El entendimiento de los elementos que conforman la respuesta Th 17 agrega complejidad a los conceptos tradicionales de inmunoregulación, pero al mismo tiempo ayudan a entender los problemas relacionados a la respuesta inmune como la diferenciación celular, respuesta inflamatoria, mediadores solubles. El ordenamiento de subseries celulares en categorías y familias facilita el entendimiento del proceso inflamatorio en diferentes enfermedades y / o diferentes estadios de las enfermedades crónicas. Por tal motivo, el conocimiento de estas vías regulatorias es necesario para comprender la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes y con esto poder contribuir al desarrollo de nuevas oportunidades terapéuticas o de intervención. Hasta estos momentos no hay información en la literatura de la respuesta Th17 en EHA.

Justificación

La enfermedad humana ocasionada por la aplicación de sustancias modelantes (EHM), aunque extinta en la mayor parte de los países desarrollados, es una entidad presente en nuestro medio, hay pocas estadísticas en relación a la prevalencia e incidencia (solo dos estudios muy grandes a nivel mundial realizados en México, uno de 279 pacientes que ha descrito las manifestaciones clínicas y otro de 350 pacientes que ha servido para estadificar un punto particular de esta enfermedad. El proceso

inflamatorio en esta enfermedad ha sido parcialmente descrito, la identificación de un nuevo tipo de células T cooperadoras Th17 asociadas a enfermedades autoinmunes no ha sido estudiada en esta condición. La EMH tiene un componente inflamatorio importante que ha sido poco estudiado, el poder identificar si existe una respuesta inflamatoria con un patrón Th1, Th2 o Th17 podría ayudar a entender la fisiopatología de la enfermedad y poder orientar a un posible tratamiento.

Planteamiento del problema

En la EHM se presenta una respuesta inflamatoria y en un porcentaje variable enfermedades autoinmunes. La enfermedad autoinmune se caracteriza por un proceso inflamatorio Th1 y recientemente se ha asociado a una respuesta tipo Th17. El espectro inflamatorio es diferente entre los pacientes, algunos desarrollan enfermedades sistémicas autoinmunes y otros no desarrollan inflamación. En estos momentos el papel Th17 en la EHM se desconoce, por lo que planteamos la siguiente pregunta de investigación:

Pregunta de investigación:

¿Se asocia la respuesta inflamatoria tipo Th1 y Th17 a las manifestaciones clínicas en la EHM?

Hipótesis

Si los pacientes con enfermedad humana por adyuvantes presentan una respuesta inmune inflamatoria tipo Th1 y/o Th17 entonces, desarrollaran una enfermedad inflamatoria sistémica y/o una enfermedad autoinmune.

Objetivo primario

1.-Caracterizar la respuesta inmune tipo Th1, Th2, y Th17 que presentan los pacientes con manifestaciones inflamatorias y autoinmunes con EHM.

Objetivos secundarios

1.- Comparar el patrón celular linfocitario en los pacientes infiltrados que presentan manifestaciones inflamatorias y/o autoinmunidad (EHM) comparado con los sujetos infiltrados que no presentan manifestaciones clínicas.

2.-Correlacionar la respuesta inmune con base al tipo de manifestaciones clínicas que presentan los pacientes.

3.-Identificar si el tipo de sustancia infiltrada influye en el tipo de respuesta inmune.

4.-Identificar si el estadio, está relacionado con la intensidad de la respuesta Th1,Th2 y Th17

5.-Evaluar el patrón de citocinas Th1/Th2/Th17 en pacientes con EHA .

METODOLOGIA

Tipo de estudio:

Observacional, descriptivo, transversal, comparativo, prolectivo.

Población de estudio

Pacientes con EHM, y sujetos con antecedentes de infiltración de sustancias modelantes sin manifestaciones clínicas enviados del servicio de cirugía plástica al servicio de reumatología de esta institución, o enviados de otras especialidades a evaluación por el servicio de reumatología.

Tamaño de la muestra

La prevalencia de manifestaciones clínicas es muy variable de publicación a publicación y difiere por el tipo de selección de los pacientes, en una serie de más de 300 pacientes con implantes de silicón aproximadamente el 83% de los pacientes tuvo alguna manifestación clínica.³²

En un estudio descriptivo realizado en nuestra población se determinó una prevalencia de enfermedades reumáticas en pacientes con EHM, el 85% presentó fibromialgia, y el 9.5% alguna enfermedad sistémica autoinmune. Estos datos se tomarán para el cálculo del tamaño de la muestra.

Tamaño de la muestra para comparación de dos proporciones:

$$n = \frac{z_{\alpha}^2 + z_{\beta}^2}{(p_1 - p_2)^2} \cdot \frac{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}{2}$$

n es el número de sujetos necesarios en cada una de las muestras

z_{α} es el valor z correspondiente al riesgo α (1.96)

z_{β} es el valor z correspondiente al riesgo β (0.84)

p_1 es el valor de la proporción en el grupo de referencia (.09)

p_2 es el valor de la proporción en el grupo del nuevo tratamiento, intervención o técnica (0.45)

p es la media de las dos proporciones p_1 y p_2 $p = \frac{p_1 + p_2}{2}$

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2}{(0.09 - 0.45)^2} \cdot \frac{0.09(1-0.09) + 0.45(1-0.45)}{2}$$

$$(1.22 + 0.537 / 0.36)^2$$

$$n = 23.81$$

Se reclutaran 48 pacientes, 24 por cada grupo

Variables:

Variables demográficas

- 1) Edad
- 2) Peso
- 3) IMC
- 4) Talla

Variable independiente

- 1) Respuesta Th1, Th2 y Th17

Variables dependientes

- 1) Inflamación sistémica
- 2) No inflamación
- 3) Enfermedad autoinmune
- 4) Estadio clínico

Las variables a analizar son sexo, edad, género, comorbilidades, región infiltrada, cantidad de sustancia infiltrada, tipo de sustancia infiltrada, tiempo de inicio de las manifestaciones clínicas (del momento de infiltración a la primera manifestación), tipo de manifestaciones clínicas, PCR, VSG, autoanticuerpos, perfil de citocinas para respuesta inmune Th1, Th2, Th17 y estadios clínicos.

Criterios de inclusión:

- Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado.
- Pacientes con aplicación de sustancias modelantes de cualquier edad, género o sexo.
- Personas con aplicación de sustancias modelantes sin manifestaciones clínicas.
- Personas con aplicación de modelantes con EHM .
- Vírgenes a tratamiento antiinflamatorio.

-Que hayan suspendido cualquier tratamiento antiinflamatorio cuando menos dos meses antes de ser incluidos.

Criterios de exclusión:

- Pacientes que retiren el consentimiento informado.
- Pacientes con inflamación en cara.
- Pacientes que no acepten tomarse muestras de laboratorio.
- Pacientes con tratamiento antiinflamatorio actual.
- Pacientes o sujetos en los que no sea posible obtener datos
- Pacientes con algún tipo de infección.

Procedimientos

Se incluirán a todos los pacientes con EHM que acudan a la clínica de tejido conectivo del servicio de reumatología y al servicio de cirugía plástica por primera vez, se contactarán también a sujetos con antecedentes de infiltración de sustancias modelantes pero sin manifestaciones clínicas, y se empleará un método de selección no probabilístico (bola de nieve) para la identificación de sujetos infiltrados sin manifestaciones clínicas. Se invitará a participar a los sujetos que cumplan con los criterios de inclusión, se explicará ampliamente el estudio y los objetivos previa lectura del consentimiento informado. Se registrarán datos demográficos, comorbilidades, tratamientos previos y actuales, se entregará un formato de autoevaluación previamente diseñado (anexo I), en donde se identificará el tipo de sustancia administrada, cantidad, localización, tiempo en el inicio de las manifestaciones clínicas (a partir de la aplicación), tipo de manifestaciones clínicas. Se tomarán muestras de laboratorio para la realización de biometría hemática completa, química sanguínea, pruebas de funcionamiento hepático, depuración de creatinina en orina de 24 hr, velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva, anticuerpos antinucleares, anti-DNAbs, factor reumatoide, anticentrómero, antiSCL-70 y muestras para análisis de respuesta Th1, Th2 y Th17, además se almacenará suero a (-20 °C) para análisis posteriores.

Procedimiento para separación de células mononucleares y obtención del fenotipo Th17

Determinación de la proporción de linfocitos con fenotipo Th17

Las células mononucleares de sangre periférica (MNSP) se separaron mediante un gradiente de densidad con Ficoll Hypaque (GE Healthcare Life Sciences), se resuspendieron en medio completo RPMI 1640 (Gibco, Gaithersburg, MD) suplementado con 2 mmol/L L-glutamina, 50 UI/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomina [Gibco] y 10% de Suero Fetal Bovino [SFB; Gibco). Se colocaron 3×10^5 de MNSP en micropozos de placas de 96 con 100 µL del Buffer FACS: PBS 1x (Invitrogen) suplementado con SFB 10% (Sigma, St. Louis, MO), EDTA 0.5mM y 0.1% de Azida de Sodio. Se evaluó el porcentaje de linfocitos con un fenotipo Th17) utilizando marcadores contra: TCD3+ (AlexaFluor 488), TCD4+ (PECy7) (Fig2), CD161+ (APC) y CD196+ (PE) (Fig3) (BioLegend). Los linfocitos se analizaron empleando citometría de flujo FacsCanto-II (Becton Dickinson). Los datos se analizaron con el software FacsDiva software (Becton Dickinson).

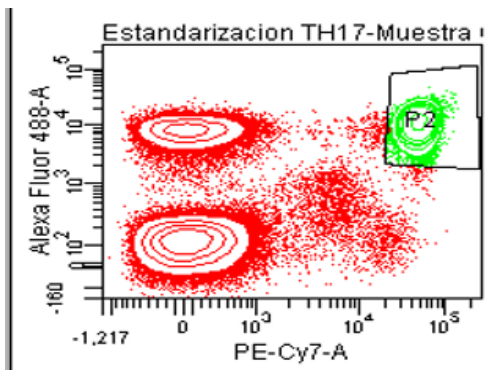


Fig.2 Identificación de las células TCD4+ (P2) PE-Cy7-A /Alexa Fluor 488-4 +

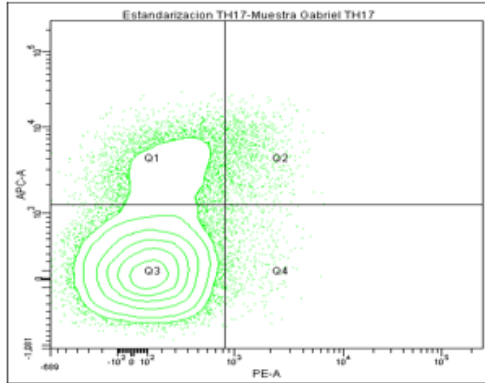


Fig.3 Identificación de células CD 161+, CD196+ (dobles positivos), que identifican a la población celular con fenotipo Th 17, en cuadrante Q2. Estas células proceden de P2

Determinación de citocinas mediante citometría de flujo

Los ensayos para detectar un fenotipo Th1, Th2 y Th17 se determinaron por el patrón de citocinas. Estos ensayos se realizaron en el laboratorio de infectología e inmunología de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la UNAM.

Se utilizó el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 cytokine kit (Becton Dickinson) en el cual se emplean perlas de captura para detectar en forma simultánea múltiples citocinas. Este kit contiene 7 poblaciones de perlas con distintas intensidades de fluorescencia en el canal APC que han sido cubiertas con anticuerpos de captura específicos para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN γ e IL- 17A.

Las células mononucleares de sangre periférica (MNSP) se separan de la sangre completa por medio de un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque y se colocan en micropozos de placas de 96 a concentraciones de 3.0×10^5 /pozo en RPMI 1640 (Gibco, Gaithersburg, MD) y suero humano normal al 10% (Sigma, St Louis, MO). Se agrega cytoestim (Miltenyl Biotec Inc.) el cual es un estimulador inespecífico de la linfoproliferación basado en anticuerpos que actúan como superantígenos en el TCR. Se agrega cytoestim 3 microlitros por 3×10^5 MNSP incubando durante 4 hr y se obtiene el sobrenadante. Se reconstituyen los estándares y se construye una curva en base 2 desde 1:2 hasta 1:256. El estándar detecta desde 20 hasta 5000 picogramos/mL. Se incuban las perlas mezcladas junto con los estándares y las muestras. Se hacen lavados y se lee en el citómetro de flujo FACS Canto II (Beckton Dickinson) y se analiza con el software FCAP Array (Beckton Dickinson). Fig. 1

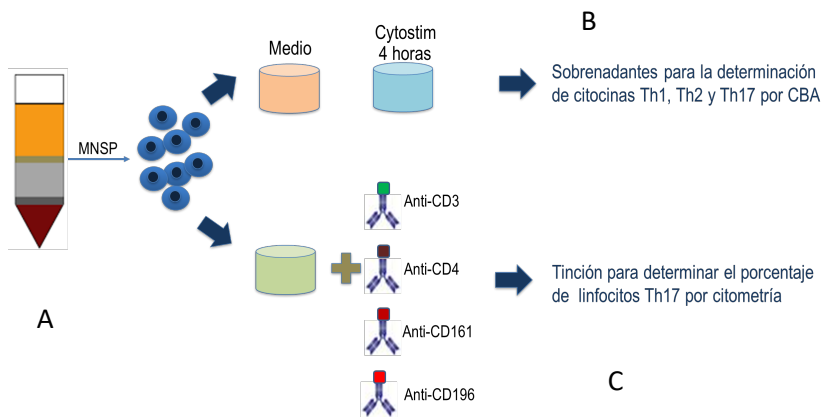


Fig.-1 Procedimiento de separación de células mononucleares mediante el uso de Fycoll. A) obtención de células mononucleares + adición de medio, B) se agrega Cytostim incubando por 4 hr para posteriormente obtener el sobrenadante y determinar citocinas Th1, Th2 y Th17. C) obtención de células mononucleares para tinción con marcadores (anti-CD3, anti-CD4, anti CD161 y anti-CD 196) y determinar el porcentaje de linfocitos Th17

Estos ensayos nos permitieron identificar el fenotipo celular y posteriormente las concentraciones de citocinas producidas por linfocitos ante un estímulo inespecífico.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo con medidas de tendencia central, análisis comparativo de los niveles de interleucinas en ambas poblaciones, una correlación de las variables clínicas y el patrón de citocinas, y para las variables cualitativas se utilizó Chi² o prueba exacta de Fisher, y para las cuantitativas con distribución normal t de Student, o con distribución no normal U de Mann Whitney, para la correlación se realizó regresión logística.

Aspectos éticos y de bioseguridad:

La participación en este estudio implicó una atención médica tradicional para la atención en este tipo de pacientes, que incluyó una evaluación en el área clínica y en el área quirúrgica, los riesgos a que fueron sometidos los pacientes fueron aquellos inherentes a las tomas de muestras de laboratorio (como dolor o el riesgo de infección de las zonas de punción, hipotensión tras las tomas de muestras sanguíneas). No existe un beneficio clínico en el paciente con la participación en el estudio. Sin embargo su participación ayudó a entender mejor el proceso inflamatorio que acontece en esta enfermedad, situación que puede tener implicaciones terapéuticas en un futuro.

A todos los pacientes se les entregó un consentimiento informado y se condujo el proyecto basado en las buenas prácticas clínicas (GCP e ICH).

Relevancia y expectativas

La relevancia de este estudio comprende el entendimiento del proceso inflamatorio en estos pacientes. Conforma parte de un gran proyecto que servirá de base para desarrollo de proyectos subsecuentes en donde se incluirán otros colaboradores para trabajar diversas líneas de investigación. Parte de este proyecto ya ha sido presentado en congresos internacionales (EULAR, Berlín 2003), actualmente la expectativa es publicación en revistas de alto impacto.

Recursos disponibles

Se contó con recursos humanos en el área médico – quirúrgica para la atención de estos pacientes (reumatólogo – cirujano plástico). En cuanto a recursos materiales, el Hospital General de México apoyo con los recursos para el procesamiento de los laboratorios generales como biometría hemática completa, química sanguínea, pruebas de funcionamiento hepático, velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva, examen general de orina y depuración de creatinina en orina de 24 hr.

En la UME (Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la UNAM, se contó con los recursos para el procesamiento de células Th1, Th2 y Th17, así como para la determinación de citocinas.

Resultados

Características clínicas

Se incluyeron a un total de 52 pacientes categorizados en: a) 25 sujetos infiltrados inflamados (EHM) y b) 27 sujetos infiltrados sin manifestaciones clínicas, todos los pacientes fueron vírgenes a tratamiento antiinflamatorio. De éstos, 46 (88.4%) fueron del género femenino y 6 (11.5%) del género masculino, categorizados en no inflamados 27 (52%) de los cuales el 85.1% fueron del género femenino y 14.8% % del género masculino ($p=0.591$) y en inflamados 25 (48%) de los cuales el 92% fueron del género femenino y 8% del género masculino ($p=0.591$). La media de edad fue de 43.11 (± 8.46) inflamados vs 43.2 (± 10.5) no inflamados ($p=0.365$), el peso fue mayor en el grupo no inflamado 66.06 (± 10.9) comparado con el grupo inflamado 64.01 kg (± 7.07) $p=0.036$, y el Índice de masa corporal (IMC) también fue mayor en el grupo no

inflamado 26.6 (± 4.18) comparado con el grupo inflamado 24.5 (± 22.19) $p=0.002$ (Tabla 1).

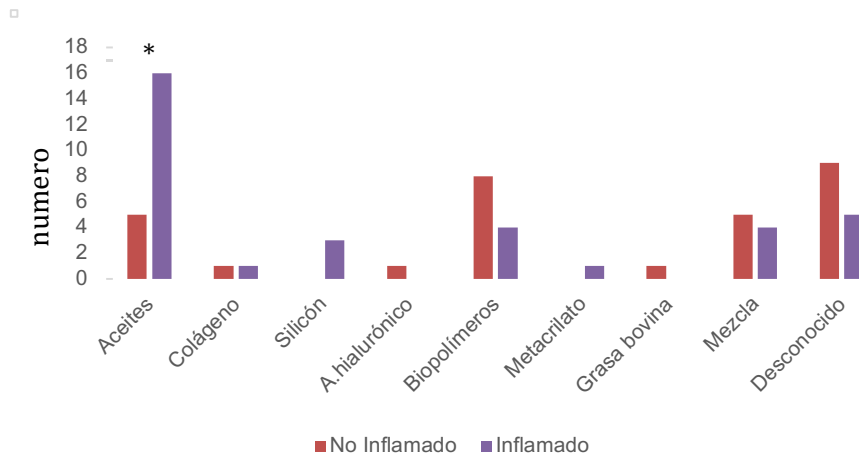
En cuanto a las sustancias infiltradas se identificó que la mayor proporción correspondió a aceites $p<0.05$ (gráfica 1), la zona más frecuentemente infiltrada fueron las nalgas 80.7% (gráfica 2a), no hubo diferencias en las zonas de infiltración entre los grupos (gráfica 2b). Las nodulaciones fueron las manifestaciones clínicas más frecuentes en ambos grupos 57.9% (Tabla 2). La diferencias en las manifestaciones clínicas entre los grupos fueron para los nódulos, hiperpigmentación, hiperemia, dolor y manifestaciones a distancia que se presentaron más frecuentemente en el grupo de pacientes inflamados $p<0$.

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes.

	Inflamados n=25 (48%)	No inflamados n=27 (52%)	p
Mujeres n (%)	23 (92%)	23 (85.1%)	
Hombres n (%)	2 (8%)	4 (14.8%)	0.591
Edad (X\pmEE)	43.11 (± 8.46)	43.24 (± 10.5)	0.365
Comorbilidad, n (%)	4 (16%)	5 (18.5%)	0.345
Peso (X\pmEE)	64.01 (± 7.07)	66.06 (± 10.99)	0.036
IMC (X\pmEE)	24.55 ± 2.19	26.61 ± 4.18	0.002

Hubo una mayor proporción de pacientes del género femenino, y los pacientes en el grupo de no inflamados tuvieron un mayor peso e IMC.

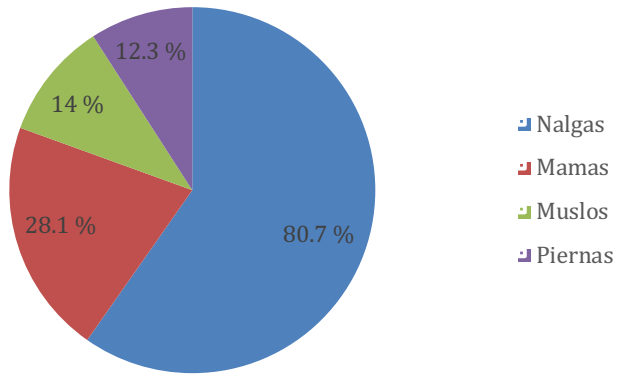
Gráfica 1. Tipo de sustancias infiltradas. El mayor número de pacientes infiltrados inflamados se observó en pacientes que se administraron aceites. *p<0.05



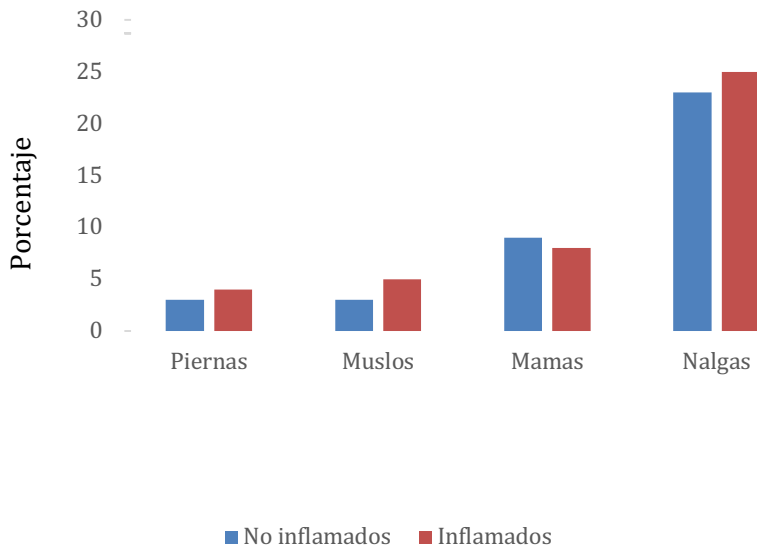
*p<0.05, la mayor proporción de los inflamados se encuentra en el grupo de los aceites

Grafica 2. Proporción de sustancias infiltradas por zona. A) Región corporal infiltrada en ambos grupos, B) diferencias en la proporción de regiones corporales infiltradas por grupo . Algunos pacientes tuvieron infiltraciones en dos o más áreas, por ello sobrepasa el 100%

A



B

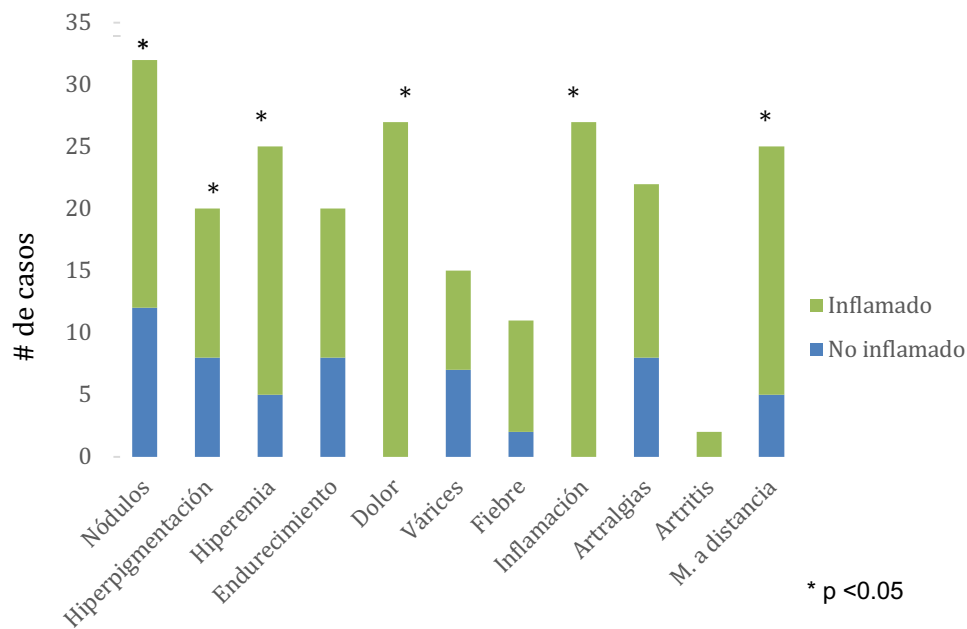


p= N.S

Tabla 2. Manifestaciones clínicas por infiltración de sustancias en ambos grupos. Las manifestaciones clínicas más frecuentes en ambos grupos fueron nodulaciones, hiperpigmentación y dolor local.

Manifestaciones	n=	%
Nodulaciones	33	(57.9%)
Hiperpigmentación cutánea	25	(52.6%)
Dolor local	30	(52.6%)
Hiperemia local	20	(43.9%)
Fiebre	30	(40.4%)
Artralgias	15	(38.6%)
Endurecimiento cutáneo	23	(35.1%)
Manifestaciones a distancia	22	(31.6%)
Várices locales	2	(26.3%)
Artritis	18	(3.5%)

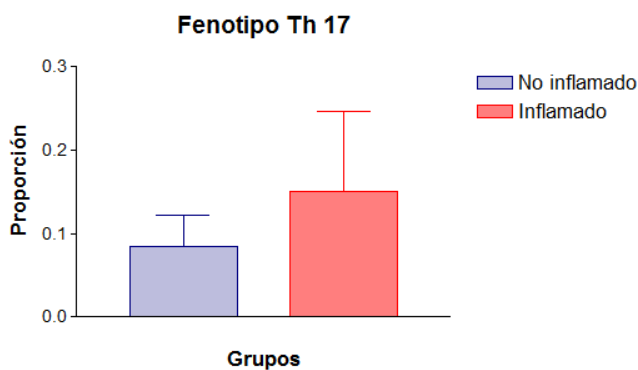
Gráfica 3. Manifestaciones clínicas por grupo inflamado y no inflamado. Hubo más pacientes con nódulos, hiperemia, inflamación y manifestaciones a distancia en el grupo de inflamados



Determinación del fenotipo Th17

En el ensayo para determinar el porcentaje del fenotipo Th17 en la población linfocitaria se observó una tendencia a un mayor porcentaje en el grupo de los inflamados 0.14+ comparado con los no inflamados 0.05+ aunque no fue estadísticamente significativo $p=0.26$, probablemente por el tamaño de la muestra.

Gráfica 4. Proporción de linfocitos con fenotipo Th17 en el grupo de pacientes inflamados y no inflamados.



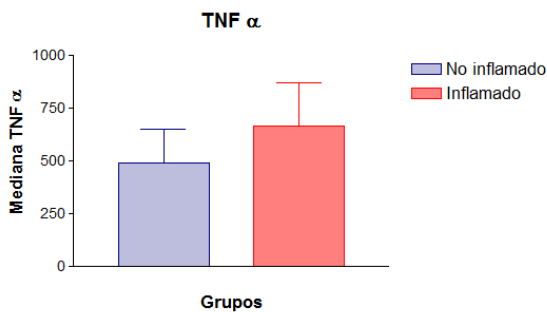
$p=0.05$

Perfil de citocinas

En el ensayo para determinar las citocinas se encontró que no hay diferencias en la citocina proinflamatoria $TNF\alpha$ entre el grupo no inflamado 492.31 ± 795.95 vs inflamado 668.00 ± 1059.10 IC 95% (-700.85 – 349.46) $p= 0.530$ (gráfica 5); para el fenotipo Th1 solo se encontraron diferencias significativas en IL-1 β en los no inflamados 2374.5 ± 4776.90 vs comparado con los inflamados 680.27 ± 1128.31 IC 95% (-539.24 – 3927.72) $p=0.023$; y para IFN γ en los no inflamados 1348.03 ± 4346.79 vs inflamados 332.48 ± 627.46 IC 95% (-682.19 – 2713.28) la IL-2 no demostró diferencias entre ambos grupos. (gráfica 6). En el fenotipo Th2 las diferencias significativas fueron para la IL-5 en el grupo de los no inflamados 15.32 ± 34.66 vs inflamados 4.35 ± 14.55 IC 95% (-6.28 – 28.24), para IL-6 en los no inflamados 9258.25 ± 15280.75 vs inflamados 4682.87 ± 5565.89 IC 95% (-1736.53 – 10887.29) $p= 0.006$; para IL-10 en el grupo de los no inflamados 118.06 ± 263.53 vs inflamados 82.70 ± 251.27 IC 95% (-108.04 – 178.76); la IL-4, IL-23 e IL-13 no demostraron diferencias significativas. (gráfica 7). En el fenotipo Th 17 la IL 17 no demostró diferencias significativas entre ambos grupos, no inflamados 78.42 ± 172.13 vs inflamados 95.63 ± 223.34 IC 95%.

Gráfica 5. Comparación del patrón de citocinas entre el grupo de pacientes inflamados y no inflamados. A) Citocina proinflamatoria, B) Patrón Th1, C) Patrón Th2, D) Th17

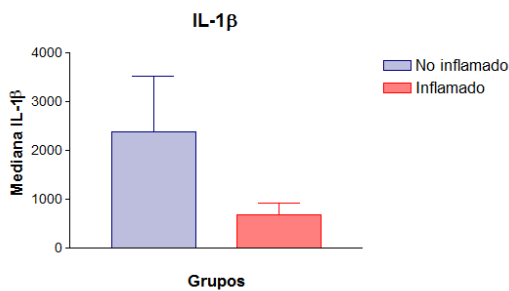
A) Citocina proinflamatoria



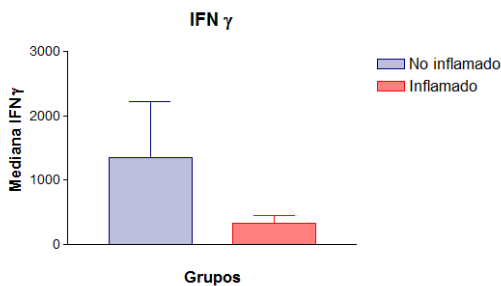
A) En ambos grupos se encontró elevación de anti-TNF α , sin embargo sin diferencia significativa.

p=0.530

B) Th 1

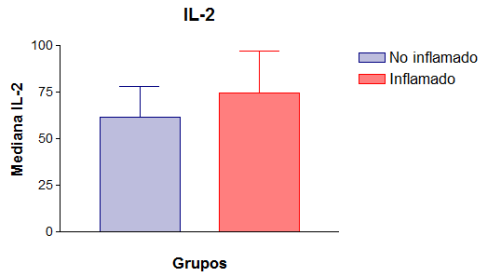


p=0.023



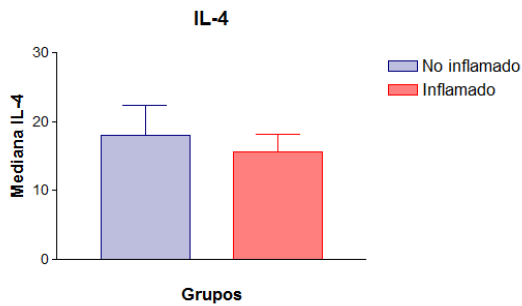
p=0.029

B) La elevación de IL-1 β e IFN γ demuestran diferencias significativas a favor del grupo de los no inflamados, denotando con esto un estado pro-inflamatorio. Esto demuestra que en los pacientes no inflamados predomina un fenotipo inflamatorio Th 1.

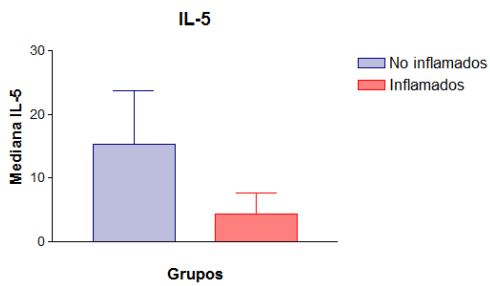


p=0.261

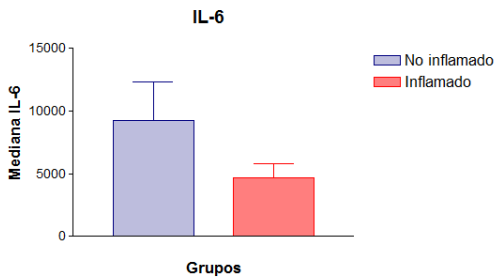
C)Th2



p=0.352



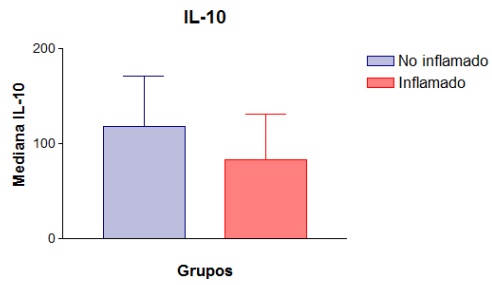
p=0.005



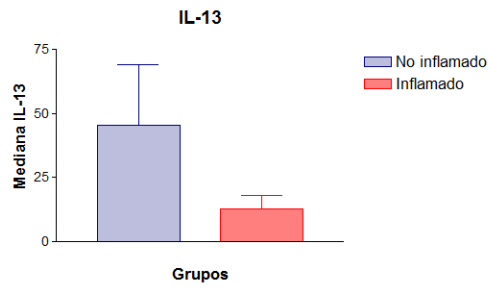
p=0.006

C)En las citocinas para evaluar el fenotipo Th2 comparando el grupo de los pacientes no inflamados contra los inflamados, paradójicamente se encontró una diferencia significativa a favor del grupo no inflamado para las citocinas IL-5, IL-6 e IL-13.

La tendencia en la elevación de IL-10 en el grupo de los no inflamados, podría explicar el porque algunos pacientes no se inflaman.

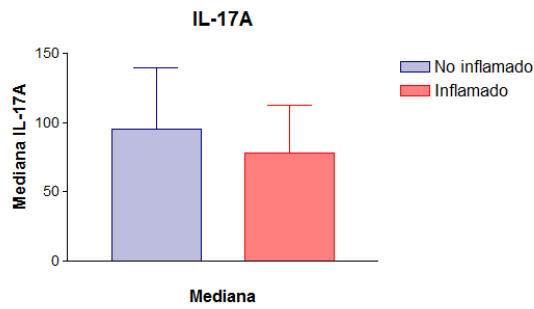


p=0.301

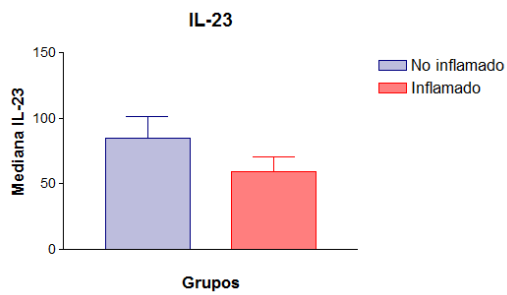


p=0.003

D) Th17



p=0.461



p=0.125

Asociación entre el fenotipo Th17 tipo de sustancias infiltradas, sitios infiltrados y manifestaciones clínicas.

Se identificó una asociación entre el fenotipo Th 17 e infiltración de aceites $r^2=0.819$ y biopolímeros $r^2=0.935$ (tabla 3), la zona infiltrada de las nalgas $r^2=0.888$ y la cantidad infiltrada $r^2= 0.841$. (tabla 4). Y en relación a las manifestaciones clínicas, la formación de nódulos fue la que tuvo la mas fuerte asociación $r^2= 0.972$ $p = 0.371$.

Tabla 3. CORRELACION ENTRE FENOTIPO Th17 y TIPO DE SUBSTANCIAS INFILTRADA

Tipo de sustancias infiltradas	Th 17 (r2)
A. eucalipto	0.819
A. vegetal	0.549
A. mineral	0.798
Colágeno	0.335
Silicón	0.629
Biopolímeros	0.935
Mezcla	0.21
Metacrilato	0.735
Grasa bovina	0.735
Desconocido	0.280

TABLA 4. CORRELACION Th 17 y ZONAS INFILTRADAS

Zonas infiltradas	Th 17 (r2)
Piernas	0.595
Muslos	0.286
Mamas	0.193
Nalgas	0.888
Cantidad	0.841

TABLA 5. CORRELACION Th 17 Y MANIFESTACIONES CLINICAS

Manifestación clínica	Th 17
Nódulos	0.972
Hiperemia	0.126
Hiperpigmentación	0.206
Endurecimiento cutáneo	0.040
Dolor local	0.091
Várices	0.509
Fiebre	0.271
Inflamación	0.075
Artralgias	0.083
Artritis	0.634
Manifestaciones de distancia	0.036

Discusión

La infiltración de sustancias modelantes es un problema de salud pública en nuestro país, el proceso inflamatorio que ocasiona es muy diverso en intensidad y manifestaciones clínicas de paciente a paciente. El proceso etiopatogénico tal vez está mejor explicado desde el punto de vista histopatológico identificándose de manera aguda un gran infiltrado neutrofilico, y de manera crónica una gran infiltración por linfocitos y macrófagos, la formación de granulomas y el tipo de respuesta inflamatoria tipo IV. Sin embargo hasta estos momentos, el papel de las citocinas en esta patología está parcialmente descrito por cuestiones históricas en el descubrimiento de las citocinas, es así que en 1994 fue descrita una gran expresión in situ de IL-1 en pacientes infiltrados con sustancias modelantes, y una sobreestimulación de los fibroblastos para producir colágena en este tipo de pacientes²⁴. A partir de aquí, y tras la evidencia de haber documentado fenómenos de autoinmunidad en estos pacientes, fue de nuestro interés el identificar el fenotipo Th17, Th1 y Th2 en pacientes infiltrados con sustancias modelantes, en este trabajo lo relevante es la categorización en sujetos inflamados y no inflamados de manera clínica y tratar de establecer las características en el perfil de citocinas en ambos grupos.

De interés, es hacer notar que en ambos grupos hay diferencias en el IMC, siendo mayor en el grupo no inflamado de manera significativa y esto podría explicar gran parte de los resultados en el perfil de citocinas observado en nuestro proyecto. Existen estudios en donde se ha demostrado que la obesidad promueve selectivamente la expansión del linaje Th17, el cual se sabe que tiene un papel prominentemente proinflamatorio⁵²

Aun cuando en la obesidad se ha descrito un fenotipo Th17, en nuestra población de estudio a pesar de que los no inflamados tienen un IMC mayor no hay una tendencia específica para un fenotipo Th17, por el contrario hay una tendencia a un mayor porcentaje de células Th17 en el grupo inflamado sin que se observe una significancia estadística, probablemente debido a un tamaño de muestra pequeño.

En los resultados obtenidos, se puede observar que en los patrones de citocinas se encontró una mayor producción de TNF α en el grupo inflamado, que es un resultado

esperado, ya que se trata de una citocina pro inflamatoria. Consecuentemente los macrófagos activados iniciarán la respuesta inflamatoria con fenotipo Th1⁵³.

En el grupo de pacientes infiltrados inflamados contrario a lo esperado encontramos una menor cantidad de citocinas Th1 (IL-1, IFN γ), Th2 (IL-5, IL-6) y Th17 (IL-13) con una diferencia estadísticamente significativa, comparado con el grupo de pacientes no inflamados. En otras citocinas como IL-2, IL-23, IL-4 e IL-17 no hubo diferencias estadísticamente significativas. En los pacientes con inflamación, esperabamos encontrar un patrón Th1 y Th17 elevado, sin embargo esto no se observó, solo TNF α estuvo mas elevado en el grupo de pacientes con inflamación. Esto podría estar explicado porque en un fenómeno inflamatorio, primero se desarrolla una respuesta tipo Th1 en la que se activan las células presentadoras de antígeno, las células TCD4 cooperadoras realizan una expansión clonal, se desarrollan células TCD8 citotóxicas, se producen citocinas que aumentan la respuesta celular, y el efecto final es la inflamación. En el caso de nuestro estudio por tratarse de un estudio transversal, en el que los pacientes ya tienen inflamación, el momento en que tomamos la muestra de sangre y medimos las citocinas esa respuesta inflamatoria celular ya habría pasado en el tiempo, por lo tanto solo estaríamos observando el fenómeno inflamatorio por la presencia del TNF α . Sin embargo, para la producción de ésta citocina proinflamatoria tuvo que haber una respuesta celular inicial tras la infiltración de sustancias. Probablemente si se hubiese estudiado el fenomeno inflamatorio en etapas iniciales habríamos detectado esta respuesta Th1 en los pacientes inflamados.

Los resultados obtenidos podrían explicar un fenómeno pro-inflamatorio en los sujetos infiltrados asintomáticos, situación que se va a agotando en el tiempo denotando un perfil de citocinas más bajo en los pacientes inflamados. En el perfil Th 2 se observó una gran expresión de IL-6 aunque mas prevalente en el grupo no inflamado. Existen trabajos en los cuales se ha identificado que la IL-6 en conjunto con TGF β , e incluso IL-6 como vía independiente inducen la diferenciación hacia células Th 17 desde las células T cooperadoras quiecentes; con terapias anti-IL6R se ha podido suprimir la diferenciación de células Th 17 antígeno específicas al inicio de las enfermedades⁵⁴.

Por otro lado, el encontrar una respuesta Th1 y Th2 en el grupo de pacientes infiltrados no inflamados, sugiere que la respuesta inflamatoria de tipo celular se está llevando a cabo en el momento en que se tomó la muestra, y que a pesar de que no hay una inflamación clínica, se observa a nivel de citocinas una respuesta tanto tipo Th1 como Th2. Este mecanismo podría estar explicado por la IL-10, que aunque no fue estadísticamente significativa, se observó una tendencia a una mayor producción en el grupo de pacientes no inflamados. Esta citocina es producida por las células T reguladoras, produce una respuesta de freno en la respuesta inmune celular. La IL-10 inhibe MHC clase II y la expresión de moléculas co-estimuladoras B7-1/B7-2 en los monocitos y macrófagos, así mismo limita la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 α y β , IL-6,IL-2,IL-18 y TNF) y quimoquinas (MCP1,MCP5,RANTES,IL-8,IP-10 yMTP-2). Nunca actúa directamente en las células T CD4, si puede regular de manera directamente la respuesta inata y adaptativa Th1 y Th2⁵⁵

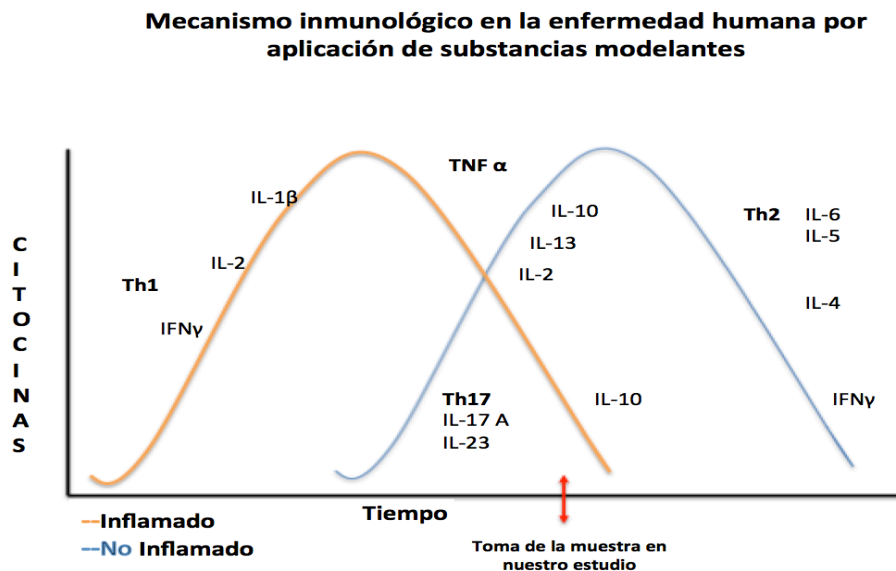
Para que la IL-4 medie la diferenciación hacia Th1, requiere de la producción previa de la IL-10 por las células dendríticas ⁵⁶

En cuanto a la respuesta Th 17, se ha observado que en algunos pacientes con enfermedad humana por administración de sustancias modelantes, a lo largo del tiempo es factible desarrollar una enfermedad sistémica autoinmune del tejido conectivo como esclerosis sistémica, artritis reumatoide, lupus eritematoso entre otras, entidades en las que se observa una población de linfocitos Th17 incrementada. En el caso de nuestro estudio, aunque estadísticamente no fue significativo, se observó casi el triple del porcentaje linfocitario de Th17 en el grupo de pacientes inflamados (0.14) contra los pacientes no inflamados (0.05) que por tratarse de una población muy pequeña, es significativo. Podría ser que esta población linfocitaria a lo largo del tiempo esté condicionando el riesgo para desarrollar una enfermedad autoinmune en el futuro, por lo que un estudio de cohorte nos podría dar mas información acerca de éste desenlace, pero por factibilidad no se realizó. Llama la atención que en la producción de IL-17 no hay diferencias estadísticamente significativas, aunque hay una tendencia en el grupo de pacientes inflamados (95 vs 78), esto pudiera estar explicado ya sea por que hay un tamaño de muestra pequeño que en poblaciones celulares tan pequeñas no alcanzamos a ver una diferencias estadísticamente

significativa, o podría ser también porque el grupo de pacientes sin inflamación tienen sobrepeso u obesidad en una mayor proporción, el IMC es mayor estadísticamente significativo en este grupo, y la obesidad también se ha asociado a un fenotipo linfocitario Th17 mayor. Siendo así, es difícil establecer en nuestro grupo de pacientes, que la producción de IL-17 esté favorecida por obesidad o bien como producto de la infiltración de sustancias modelantes.

Encontramos una correlación entre el fenotipo Th17 con la infiltración de aceites, biopolímeros, la cantidad infiltrada, la zona infiltrada, específicamente las nalgas y la presencia de nódulos como signo clínico. Este tipo de correlación podría sugerir que el aplicar estas sustancias en las nalgas, en una gran cantidad y desarrollar nodulaciones, podría asociarse a una respuesta Th17 que en un futuro podría manifestarse como una enfermedad autoinmune. Esto abre la posibilidad a varios estudios en los que se debería identificar el papel de esta población linfocitaria en las manifestaciones clínicas de los pacientes con infiltración de sustancias modelantes a largo plazo.

Con base en esto proponemos el siguiente mecanismo patogénico de las sustancias modelantes como adyuvantes. **Gráfica 6**



En ambos grupos de pacientes tanto en los inflamados como los no inflamados existe una respuesta pro inflamatoria tipo Th1, en los no inflamados y en un grupo de los inflamados también se observa una respuesta tipo Th2, con aumento específico de la IL-10 que es una citocina anti inflamatoria (situación que podría explicar porque algunos pacientes no se inflaman). En el momento de la toma de la muestra ya pasó la respuesta celular y solo se observa TNF α , observamos una respuesta tanto Th1 como Th2 en los no inflamados, muy probablemente si esto se perpetúa, en un futuro también desarrollarían inflamación clínica.

Conclusiones

En el grupo de pacientes con inflamación se observó una mayor tendencia de fenotipo Th17, así como una disminución en la respuesta Th1 e IL-10, lo que sugiere una respuesta celular previa ya controlada.

En este mismo grupo se observó un aumento de TNF alfa que es una citocina proinflamatoria, asociada a inflamación, por lo que corresponde con las manifestaciones clínicas.

En el grupo de pacientes no inflamados se presentó un patrón de respuesta combinada Th1 (IL-1 β , IFN γ)/Th2 (IL-5, IL-6, IL-13) con una mayor concentración de IL-10 comparado con el grupo de inflamados, lo que sugiere un proceso inflamatorio que es controlado por el incremento de IL-10 que probablemente explique la ausencia de manifestaciones clínicas en este grupo.

El grupo de pacientes no inflamados presentó un mayor sobrepeso y/u obesidad que el grupo de inflamados que puede explicar las no diferencias entre la producción de IL-17 y el fenotipo Th17.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Boo-Chal K. Parafinoma. *Plast Reconstr Surg* 1965; 36: 101-110.
- 2.- Kozeny GA, Barbato AL, Bansal VK, Vertuno LL, Hano JE Hypercalcemia associated with silicone-induced granulomas. *N Engl J Med.* 1984 Oct 25; 311(17):1103-5.
- 3.- Miyoshi K, Miyaoka T, Kobayashi Y, Itahura T, Nishijo K, Higashitara M, Shiragami H, Ohno F: Hypergammaglobulinemia by prolonged adjuvancy in men: disorder developed. After augmentation mammoplasty. *JJapMed* 1964; 2122: 9-14.
4. - Wilkie T. Late development of granuloma after liquid silicone injections. *Plast and Reconstr Surg* 1977; 60: 179-188.
5. -Miyoshi K, Shiragami H, Yoshida K. Adjuvant disease of men. *Clin Immunol* 1973; 5: 785–794.
6. - Scheel L, Riper J. Toxicity of silica. *Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine* 1954; 9: 29-36.
- 7.-Edelman D, Grant S, Van Os W. Autoimmune disease following the use of silicone gel-filled breast implant: A review of the clinical literature. *Sem in Arthritis Rheum* 1994; 24: 183-189.
8. - Sánchez-Guerrero J, Schur P, Sergent J, Liang M. Silicone breast implants and rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 158-168
9. - Vasey F, Selenik M, Wells A. Rheumatic disease symptoms and silicone breast implants: comment on the article by Cook et al and the article by Sánchez-Guerrero et al. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 719-720
- 10.- Torres Gómez B, Medrano Ramírez G, Priego Blancas R, Peláez Ballestas I, Burgos Vargas R. Enfermedad por la infiltración de sustancias modelantes con fines estéticos *Cir Plast*2010; 20:124-132
- 11.- Torres Gómez B, Burgos Vargas R, Medrano Ramírez G, Priego Blancas B. Instrumento para evaluar y estadificar el daño producido por la infiltración de sustancias modelantes *Cirugía plástica* 2010;20: 105-111
- 12.- Priego Blancas R; Jorge Cárdenas R; Pérez Cerezo R; Rincón Lozano R; Torres Gómez B; Haddad J. Enfermedad humana por modelantes. Análisis de sustancias por espectrometría de resonancia magnética. *Cirugía Plástica* 2010; 20:120-123
- 13.- Rees T, Ballantyne D, Seidman I, Hawthorne G. Visceral response to subcutaneous and intraperitoneal injections of silicone in mice. *Plast Reconstruct*

Surg 1967; 39: 402-1

- 14.-Adler A, Etzion Z, Berlyne G. Uptake, distribution and excretion of silicone in normal rats. *Am Phys Soc* 1986: E670-E673.
- 15.-Ben-Hur N, Ballantyne D, Rees T, Seidman I. Local and systemic effect of dimethylpolysiloxane fluid in mice. *Plast Reconstr Surg* 1967; 39: 423-426.
16. Menezes RC, Tiziani V, Cintra L, Amstalden I, Badan PF. Local reaction and migration of injected silicone gel: Experimental study. *Aesthetic Plast Surg* 1993; 17: 335-338.
17. - Chastre J, Bouchama A, Basset F. Acute pneumonitis after subcutaneous injections of silicone in transsexual men. *N Engl J Med* 1983; 308: 764-767
18. - Kircher T. Silicone lymphadenopathy. *Hum Pathol* 1980; 11: 240-244
- 19.-Yumagai Y, Shiokawa Y, Medsger T, Rodnan G. Clinical spectrum of the connective tissue disease after cosmetic surgery. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 1-12.
- 20.-Appleton B, Lee P. The development of systemic sclerosis (Scleroderma) following augmentation mammoplasty. *J Rheumatol* 1993; 20: 1052-4.
- 21.-Cukier J, Beauchamp R, Spindler J, Spindler S, Lorenzo C, Trentham D. Association between bovine collagen dermal implants and a dermatomyositis or a polymyositis-like syndrome. *Ann Intern Med* 1993; 118: 920-928.18.
22. - (Wilkie T. Late development of granuloma after liquid silicone injections. *Plast and Reconstr Surg* 1977; 60: 179-188.
- 23.-Travis W, Balagh K, Abraham J. Silicone granulomas: report of three cases and review of the literature. *Hum Pathol* 1985; 16: 19-27.
- 24.-Cabral A, Alcocer-Varela J, Orozco-Topete R, Reyes E, Fernández Dominguez L, Alarcon-Segovia D. Clinical, histopatological and fibroblast studies in 30 patients with subcutaneous injections of modelants including silicone and mineral oils *Rev Invest Clin* 1994;46:257-66
25. - Haddad-Tame JL, Nieto Pérez A, Saade-Jalil A, González Lazzeri S, Muñoz Olvera R, Rizo Gustavo. Reconstrucción mamaria con colgajo de TRAM bilateral en pacientes mastectomizados por mastopatía por modelantes. *Anales Medicos*, 2006, 51: 24-28
26. - Israeli Eitan, Agmon-Levin Nancy, Blank Miri, Shoenfeld Yehuda. Adjuvants and autoimmunity. *Lupus* 2009; 18:1217e25
- 27.- Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:287e93.

- 28.- McKee AS, Munks MW, MacLeod MK, Fleenor CJ, Van Rooijen N, Kappler JW, et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol* 2009; 183:4403-14.
- 29.- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008; 453:1122-6.
- 30.- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica phagosomal crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through destabilization. *Nat Immunol* 2008; 9:847-56.
31. - Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Chronic fatigue syndrome with autoantibodies e the result of an augmented adjuvant effect of Hepatitis B vaccine and silicone implant. *Autoimmun Rev* 2008; 8:52-5.
- 32.- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008 Aug; 9(8):847- 56.
33. - Israeli Eitan, Agmon-Levin Nancy, Blank Miri, Shoenfeld Yehuda. Adjuvants and autoimmunity. *Lupus* 2009; 18:1217 - 25
34. -Perricone C, Colafrancesco S ,. Mazor R, Soriano A , Agmon-Levin N, Shoenfeld Y, Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) 2013: Unveiling the pathogenic, clinical and diagnostic aspects *J Autoimmun* 2013;47:1 – 16
- 35.-Vera-Lastra O, Cruz-Domínguez MDP ,Ramírez Pablo, Gayosso Rivera JA, Domínguez Anduaga, Torres Lievana, et al. Human adjuvant disease induced by foreign substances. A new model of ASIA (Shoenfeld síndrome) *Lupus*, 2012; 21: 128
- 36.- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes *Nature* 1996; 383:787-93
- 37.- Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells *J Immunol* 2000 165: 6107-15
- 38.- Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E, Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties *Semin Immunol* 2007; 19:362-71
39. - Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natviq JB IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells *J Immunol* 1999; 162:1246-51

40. -Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, et al Human IL-17: A novel cytokine derived from T cells J Immunol 1995; 155:5483-5486
41. -Hisakata Yamada Current perspectives on the role of IL-17 in autoimmune disease J Inflamm Res 2010; 3: 33-44
- 42.-Honorati MC, Meliconi R, Pulsatelli L, Cane S, Frizziero L, Facchini A. High in vivo expression of interleukin-17 receptor in synovial endothelial cells and chondrocytes from arthritis patients. Rheumatology 2001; 40: 522-527.
43. - Hwang SY, Kim HY. Expression of IL-17 homologs and their receptors in the synovial cells of rheumatoid arthritis patients. Mol Cells 2005; 19: 180-184
44. - Waite JC, Skokos D Th17 response and inflammatory autoimmune diseases Int J Inflamm 2012, doi:10.1155/2012/819467
- 45.- Cho ML, Yoon CH, Hwang SY, Park MK, Min SY, Lee SH, et al. Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: cross-talk between T cells and synovial fibroblasts. Arthritis Rheum 2004; 50: 776-784
- 46.-Kimura A, Kishimoto T IL-6: regulator of Treg/Th17 balance Eur J Immunol 2010 40; 1830-5
- 47.- Raza K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee CY, Akbar AN, et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. Arthritis Res Ther 2005; 7: R784- R795
- 48.- Nalbandian A, Crispín JC, Tsokos GC. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. Clinical and Experimental Immunology. 2009;157:209-215.
49. - Zhu J, Paul WE. CD4T cells: Fates, functions, and faults. Blood. 2008; 112:1557–69.
50. - Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. Semin Immunol. 2007;19:362–71.
- 51.- Yang J, Sunrud M, Skepner J, Yamagata T Targeting Th17 cells in autoimmune diseases Trends in Pharmacological Sciences 2014;35 : 493 – 500
52. -.Winer S, Paltser G, Chan Y, Tsui H, Engleman E, Winer D,et al Obesity predisposes to Th17 bias Eur J Immunol. 2009 ;39:2629-35.
53. -Hernandez-Pando R, Rook G.A, The role of TNF-alpha in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance.Immunology. 1994; 82(4): 591–595.

54. -Fujimoto M, Serada S, Naka T Role of IL-6 in the development and pathogenesis of CIA and EAENihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2008 ;31:78-84.

55. -Kevin N. Couper, Daniel G. Blount, Eleanor M. Riley. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection J Immunol 2008; 180:5771-5777

56. -Yongxue Yao, Wei Li, Mark H. Kaplan, Cheong-Hee Chang Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells J Exp Med. 2005 ; 201: 1899–1903.

ANEXOS

Variable	Tipo	Definición operacional	Unidad de medida	Análisis estadístico
Demográficas				
Edad	Cuantitativa Discreta Independiente	Años cumplidos	años	t Student
Género	Cualitativa Nominal Independiente	Características biológicas y fisiológicas que definen a un hombre y a una mujer	M / F	X ²
Talla	Cuantitativa	En centímetros	cms	t Student
Peso	Cuantitativa	En Kg	Kg	t Student
Dependientes				
Dolor	Dependiente Cualitativa Nominal (Dicotómica)	Evaluación subjetiva de nocicepción	Presente / ausente	X ² Regresión logística
Eritema local	Dependiente Cualitativa Nominal (Dicotómica)	Lesión cutánea eritematosa en área infiltrada	Presente / ausente	X ² Regresión logística
Inflamación local	Dependiente Cualitativa Nominal (Dicotómica)	Aumento de temperatura, calor y dolor en área infiltrada	Presente / ausente	X ² Regresión logística

Fiebre	Dependiente Cualitativa Nominal (Dicotómica)	Aumento de temperatura arriba de 38° C	Presente ausente	/	X ² Regresión logística
Artralgias			Presente ausente		X ²
Artritis					
Enfermedad autoinmune	Dependiente Cualitativa Nominal (Dicotómica)	Enfermedad inflamatoria asociada a la presencia de AAN + 1: 160, o bien que cumpla criterios ACR para alguna enfermedad sistémica autoinmune del tejido conectivo.	Presente ausente	/	X ² Regresión logística
Independientes					
TH1	Dependiente Cuantitativa	IFN gama, IL-2	Presente ausente	/	t Student Regresión logística
TH2	Dependiente Cuantitativa	IL-4,IL-5,IL-6,IL-10,IL3	Presente ausente	/	t Student Regresión logística
TH17	Dependiente Cuantitativa	IL-17, IL-23	Presente ausente	/	t Student Regresión logística
Confusoras					
Obesidad, embarazo, enfermedad autoinmune previa					
Asma cualquier otra que aumente Th1 o Th17					

