

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE INTERLEUCINA - 10
(IL-10) EN PACIENTES DISLIPIDÉMICOS**



Guatemala, marzo del 2008

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urízar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	Vocal IV
Br. José Juan Vega Pérez	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A DIOS	Padre y maestro de nuestras vidas.
A mis padres Rodolfo y Mila	A quienes debo toda mi existencia, con amor eterno.
A mi esposa e hijos	Fuente de mi inspiración diaria.
A mi familia	Con amor fraterno.
A mis catedráticos	Por sus sabias enseñanzas.
A mis amigos	Los mejores del mundo.
A ULTRALAB	Por permitir mi desarrollo profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mis revisores: Licda. Alba Marina Valdés y Licda. María Eugenia Castellanos, por sus sabios consejos.

Al Lic. Guillermo Reyes, por su apoyo y dedicación.

A mis catedráticos, en especial al Lic. Gustavo Gini, Licda. Diana Freyre, Lic. Federico Nave.

A la Casa del Paciente Crónico, DPC MEDLAB Guatemala y Laboratorio ULTRALAB, por permitirme realizar la investigación.

A mis hermanos y amigos, que siempre me han brindado su apoyo incondicional.

INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	5
A. Dislipidemias	5
B. Clasificación de las Dislipidemias	6
1. Hipercolesterolemia aislada	6
2. Hipertrigliceridemia aislada	8
3. Hiperlipidemias mixtas	9
4. Déficit aislado de HDL	10
C. Diagnóstico en el Laboratorio Clínico	11
1. Lípidos séricos	11
2. Riesgo Cardiovascular Global (RCG)	13
D. Fisiopatología de la Aterosclerosis	14
1. La Disfunción Endotelial	14
2. Vulnerabilidad de la Placa Aterosclerótica	16
E. La Inflamación y la Aterosclerosis	17
F. Papel de la IL-10	22
1. Papel de la IL-10 en la Aterosclerosis	22
2. Propiedades Antinflamatorias de la IL-10: Mecanismos de Acción	23
3. Modulación la Respuesta Inmune Celular por IL-10	25
4. La Presencia de IL-10 en las Placas de Aterosclerosis	26
5. La IL-10 y la Vulnerabilidad de la Placa Aterosclerótica	27
6. Regulación de Fenómenos Protrombóticos: Papel de la IL-10	28
7. Evidencias Experimentales del Papel Protector de la IL-10 en la Aterosclerosis	29
G. Determinación de la IL-10 en el Laboratorio Clínico	30
1. EIA	30
2. Quimiluminiscencia	31

IV. Justificación	33
V. Objetivos	34
VI. Hipótesis	35
VII. Materiales y Métodos	36
A. Universo de Trabajo	36
B. Recursos	36
C. Toma de Muestra	38
1. Procesamiento de Muestras	39
a. Determinación de Triglicéridos	39
b. Determinación de Colesterol Total	40
c. Determinación de Colesterol HDL	40
d. Determinación de Colesterol LDL	41
e. Determinación de Interleucina-10	42
3. Control de Calidad	42
4. Diseño de la Investigación	43
VIII. Resultados	45
IX. Discusión de Resultados	49
X. Conclusiones	52
XI. Recomendaciones	53
XII. Referencias	54
XIII. Anexos	59

I. RESUMEN

En la presente investigación se determinaron los niveles séricos de interleucina 10 (IL-10) en pacientes dislipidémicos, clasificados en base al perfil lipídico, específicamente con hipercolesterolemia (nivel sérico de colesterol mayor a 200 mg/dL).

Fueron evaluados 96 pacientes que asistieron a consulta médica a la “Casa del Paciente Crónico” y que cumplieron con los criterios de inclusión, los cuales eran tener una edad mínima de 18 años, un nivel sérico de colesterol total mayor a 200 mg/dL y que aceptaron de forma escrita participar en la investigación a través de la firma de la boleta de consentimiento específica para el estudio.

En la misma boleta se le solicitó al paciente que brindara información sobre su edad, sexo y notificación de algún o algunos padecimientos adicionales que pudieran ser factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como diabetes, hipertensión, artritis, etc.

A todos los pacientes se les evaluó el perfil de lípidos, aunque en la presente investigación solo fueron tomados en cuenta los resultados de colesterol total, los restantes componentes lipídicos no fueron incluidos, pero sí le fueron reportados al paciente para seguimiento médico o tratamiento.

De los 96 pacientes que participaron, 61 (63,54 %) fueron hombres y 35 (36,46 %) mujeres. De las enfermedades listadas en la boleta, 25 pacientes (26,04 %) mencionaron padecer hipertensión, 20 (20,83 %) reportaron dos o más enfermedades.

Aproximadamente el 84 % de los pacientes evaluados reportaron tener algún otro factor de riesgo predisponente adicional a la hipercolesterolemia para el padecimiento de enfermedades cardíacas, siendo la más frecuente la hipertensión, y únicamente 15 (15,63 %) informaron no tener ningún padecimiento adicional.

De los 20 pacientes con dos o más enfermedades, 10 de ellos (50 %) mencionaron sufrir hipertensión y alergia, 5 (25 %) reportaron hipertensión, alergia y artritis y los 5 restantes (25 %) padecen de diabetes e hipertensión.

La determinación de IL-10 se realizó por medio de una prueba automatizada por método de quimioluminiscencia, resultando que 89 (92,71 %) de los pacientes

tienen un nivel sérico de IL-10 por debajo del valor normal y únicamente 7 (7,29 %) tiene un nivel sérico en el rango normal (5,0 a 9,1 pg/mL).

La determinación de niveles de IL-10 por quimioluminiscencia puede ser utilizada de forma rutinaria, como un marcador predictivo de procesos inflamatorios y más específicamente de enfermedad coronaria si está ligado a hipercolesterolemias, siendo una prueba que se puede implementar en laboratorios clínicos por medio de pruebas EIA.

II. INTRODUCCION

La enfermedad arterial coronaria (EAC) es una afección de alta prevalencia y una de las más importantes causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. El proceso subyacente en la EAC es la aterosclerosis y actualmente se acepta que se trata de una enfermedad inflamatoria crónica de la pared arterial. La presentación clínica más severa de este proceso es el síndrome coronario agudo, angina inestable e infarto, que ocurre secundariamente a la oclusión de las arterias coronarias (1, 2).

Los estudios actuales de la fisiopatología de la aterosclerosis divergen marcadamente de los realizados en las últimas décadas. Hoy en día se acepta de manera generalizada que la inflamación desempeña un papel fundamental en el desarrollo y progresión de dichas lesiones, condicionando la aparición de manifestaciones clínicas en la evolución de estos procesos (3 - 5).

El estudio histopatológico de las lesiones ateroscleróticas revela la presencia de células inflamatorias (linfocitos T y macrófagos activados), así como de abundantes citocinas proinflamatorias tales como la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), o el interferón gamma (INF- γ), que modulan la respuesta inflamatoria local, alterando la estabilidad de la placa aterogénica y favoreciendo el desarrollo de acontecimientos cardiovasculares agudos. La interleucina 10 (IL-10) es una citocina antiinflamatoria capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias producidas por los linfocitos T y los macrófagos, así como otras funciones inflamatorias de estas células. Su presencia ha sido demostrada en las placas ateroscleróticas humanas y se ha determinado que los valores séricos bajos de IL-10 condicionan el desarrollo de lesiones ateroscleróticas más extensas y morfológicamente más inestables. Las evidencias disponibles en la actualidad sugieren un potencial papel protector de la IL-10 en el desarrollo de la aterosclerosis. Este nuevo enfoque de la enfermedad coronaria como una enfermedad inflamatoria crónica, puede ser de vital importancia para la investigación de cardiopatía isquémica (1, 6 - 8).

En la presente investigación se evaluaron los niveles de interleucina 10 (IL-10) en pacientes dislipidémicos que presentaron hipercolesterolemia, con una edad mínima de 18 años y que aceptaron participar por medio de la firma de la boleta de consentimiento.

Estos eventos se han asociado a mayor riesgo de cardiopatías coronarias debido a la alta probabilidad de formación de ateromas. Los niveles de interleucina 10 (IL-10) se midieron por inmunoensayos cuyo principio es quimioluminiscencia y los niveles de colesterol se determinaron utilizando métodos enzimáticos, colorimétricos a punto final. Los resultados podrían ser de utilidad para el mejor tratamiento y pronóstico de futuros eventos coronarios o inflamatorios de pacientes dislipidémicos.

III. ANTECEDENTES

A. Dislipidemias

Las dislipidemias son trastornos que afectan a las lipoproteínas séricas, y estas pueden ser causadas por defectos genéticos (dislipidemias primarias), o bien por patologías o factores ambientales (dislipidemias secundarias). En muchas ocasiones los defectos genéticos requieren de la presencia de factores secundarios para lograr la expresión clínica de la enfermedad (dislipidemias mixtas) (9, 10).

Comprenden situaciones clínicas en que existen concentraciones anormales de colesterol total (CT), colesterol de alta densidad (C-HDL), colesterol de baja densidad (C-LDL) y/o triglicéridos (TG). Las dislipidemias constituyen un factor de riesgo mayor y modificable de enfermedad cardiovascular, en especial coronaria. Además los niveles muy elevados de TG se asocian al desarrollo de pancreatitis aguda (11, 12).

Existen causas secundarias de dislipidemias. El hipotiroidismo y las nefropatías aumentan el C-LDL. La obesidad central, intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus (DM), reemplazo hormonal con estrógenos vía oral, tiazidas y bloqueadores beta adrenérgicos se asocian a aumento de TG (13).

Las lipoproteínas son partículas formadas por una fracción proteica (apolipoproteínas) y una fracción lipídica (colesterol, triglicéridos) y son las encargadas del transporte de los lípidos del plasma. Mediante el uso de ultracentrifugación se han reconocido cuatro fracciones o tipos de lipoproteínas: los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las de alta densidad (HDL). Debido a que su determinación cuantitativa es compleja desde el punto de vista del laboratorio clínico se utiliza la medición del componente lipídico y la identificación semicuantitativa a través del análisis electroforético para la clasificación del tipo y grado de la dislipidemia (9, 14).

B. Clasificación de las Dislipidemias

Se utiliza una clasificación clínica de estas patologías metabólicas

1. Hipercolesterolemia aislada

Las principales causas genéticas son la hipercolesterolemia familiar, la dislipidemia familiar combinada y la hipercolesterolemia poligénica. Se asocia a patologías como el hipotiroidismo, el síndrome nefrótico en etapa avanzada y a la colestasis. Los principales factores ambientales son un consumo excesivo de colesterol, grasas saturadas y transácidos grasos, los andrógenos, progestágenos y anabólicos de origen androgénico (14, 15).

La hipercolesterolemia familiar, tiene una prevalencia de 1 al 2 por mil en la población mundial y se asocia a un alto riesgo de cardiopatía coronaria. Es causada por un defecto en la captación y o internalización de las LDL a nivel celular. Existen antecedentes de cardiopatía coronaria precoz y dislipidemia familiar y por su carácter autosómico dominante el caso índice siempre tendrá un padre afectado, que presentará una hipercolesterolemia aislada al igual que los hermanos e hijos. Con frecuencia se observan depósitos tisulares, arco corneal, xantomas tendinosos y tuberosos. La forma homocigota se presenta en 1 de cada millón de individuos en el mundo y se manifiesta desde la infancia. Se caracteriza por ausencia de receptores a LDL, niveles de colesterol total, C-LDL extremadamente altos (> 600 mg/dL), arco corneal, xantomas tendinosos, estenosis aórtica y cardiopatía coronaria en la segunda década de la vida. La forma heterocigota se identifica por niveles de colesterol total mayores de 350 mg/dL y por la presencia de arco corneal y xantomas tendinosos y se asocia fatalmente a enfermedad coronaria que aparece entre la tercera y cuarta década de la vida (14-16).

La dislipidemia familiar combinada, con una prevalencia de 3 a 5 por mil a nivel mundial, se asocia a un alto riesgo de cardiopatía coronaria. Es la consecuencia de una activación o sobre-expresión del gen de Apo B y se asocia a un incremento

de la síntesis y secreción de VLDL. También existen antecedentes familiares de cardiopatía coronaria precoz y dislipidemia familiar, pero con una expresión fenotípica variable en los familiares. Ello es debido a que en las formas leves y moderadas predomina la elevación de VLDL y en las formas severas, debido a secreción hepática de VLDL pequeñas con vía preferencial hacia LDL, predomina el incremento del LDL y del colesterol total. Se asocia a depósitos tisulares (14, 16, 17).

La hipercolesterolemia poligénica, es un síndrome poco definido que reconoce antecedentes familiares. Aunque no se ha identificado el defecto a nivel molecular, se señala como la causa genética con mayor prevalencia y se presenta como una hipercolesterolemia aislada leve o moderada. Se ha sugerido como posible causa de defectos en las señales implicadas en la regulación del colesterol en la secuencia absorción, captación hepática y actividad del receptor (18).

El hipotiroidismo clínico, con niveles bajos de T4 y T3, se asocia a hipercolesterolemia aislada, ya que la hormona tiroidea está involucrada en la regulación del número de receptores de LDL. Se ha demostrado en el hipotiroidismo un defecto en la catabolización de las LDL, pudiendo llegar a expresarse como una hipercolesterolemia severa (14, 16).

El síndrome nefrótico en su fase avanzada, se expresa como hipercolesterolemia aislada. Existe una mayor síntesis y secreción de VLDL, con vía preferencial hacia LDL, como una reacción general de las proteínas de fase rápida en respuesta a la pérdida de albúmina. Puede llegar a inducir una hipercolesterolemia severa (19, 20).

La colestasia intrahepática y extrahepática, se asocia a hipercolesterolemia aislada. Existe retención de la lipoproteína "X", vehículo de transporte del colesterol en la vía biliar, que tiene características fisicoquímicas idénticas a las LDL. En las formas crónicas y severas, se asocia a depósitos tisulares e hipercolesterolemias muy elevadas (21).

El incremento del consumo de colesterol, grasas saturadas y transácidos grasos en individuos susceptibles (hipercolesterolemia poligénica, fenotipos de Apo E4) induce una hipercolesterolemia aislada leve a moderada. Los

andrógenos, progestágenos y anabólicos de origen androgénico pueden inducir una hipercolesterolemia aislada (15-17).

2. Hipertrigliceridemia aislada

En general, corresponden a defectos leves a moderados del metabolismo de VLDL, ya que los defectos severos se expresan como hiperlipidemia mixta, debido al contenido significativo del colesterol de las VLDL (14, 15).

Como causas genéticas, se reconoce a las dislipidemias familiares combinadas, los déficit leves de Apo C2 y lipasa lipoprotéica periférica y la sobre-expresión de Apo C3 (14, 15).

Como causas patológicas secundarias a la obesidad, diabetes mellitus y a la insuficiencia renal y al síndrome nefrótico en etapas tempranas. Como causas ambientales al consumo excesivo de hidratos de carbono especialmente refinados y de alcohol, al uso de betabloqueadores, estrógenos y diuréticos tiazidicos (15).

En el síndrome de resistencia a la insulina e hiperinsulinismo hay incremento de la síntesis de VLDL y se acelera el catabolismo de las HDL. Este se encuentra asociado a la obesidad de predominio abdominal y a la diabetes tipo 2 y entre sus componentes existe la dislipidemia que característicamente se expresa como una hipertrigliceridemia con nivel de C-HDL bajo. Los betabloqueadores y diuréticos tiazidicos, acentúan la resistencia insulínica. En la diabetes mellitus tipo 1 y en la insuficiencia renal pueden encontrarse estas dislipidemias a causa de una inhibición del sistema lipasa lipoproteico periférico (14, 20).

Los estrógenos administrados por vía oral y el alcohol inducen un incremento de la síntesis y secreción de VLDL. Su efecto es dosis dependiente y magnificada en la presencia de otras condiciones que alteren el metabolismo de las VLDL. Una dieta rica en fructosa, glucosa, sacarosa o con una alta proporción de calorías glucídicas puede inducir hipertrigliceridemia aislada, en especial si hay coexistencia con otros factores que modifiquen las VLDL (15, 17).

Con excepción del alcohol y de los estrógenos, las hipertrigliceridemias cursan con una reducción de los niveles del colesterol de HDL, en virtud de la

transferencia de triglicéridos de VLDL hacia HDL. Esto incrementa la afinidad de las HDL por la lipasa hepática, la que las lleva a catabolismo terminal. El alcohol y los estrógenos estimulan la síntesis de Apo A1 y la síntesis de HDL y en general, se asocian a elevación de sus niveles (14).

El riesgo cardiovascular de las hipertrigliceridemias aisladas sigue siendo materia de controversia. Sin embargo, se acepta como un factor de riesgo independiente en mujeres y en diabéticos y posiblemente en hombres sanos y también en aquellos con cardiopatía coronaria. Su posible rol patogénico estaría relacionado con la reducción de los niveles del colesterol de HDL y por un incremento de la densidad y reducción del tamaño de las LDL, que las hace más susceptibles a la oxidación. Además, la hipertrigliceridemia tiene un efecto trombogénico, al incrementar los niveles del inhibidor del factor activador del plasminógeno (PAI-1) (18, 20).

3. Hiperlipidemias mixtas

Puede tener un origen genético como la dislipidemia familiar combinada, disbetalipoproteinemia, defectos severos relacionados con déficit de Apo C2 y lipasa lipoprotéica periférica y por sobre-expresión de Apo C2. Una de las características de esta forma de dislipidemia es su multicausalidad, con concurrencia de factores genéticos, patológicos asociados y ambientales que interfieren con el metabolismo de las VLDL y LDL. Así, se puede dar un defecto genético del metabolismo de las VLDL asociado a obesidad o diabetes mellitus, o con una hipercolesterolemia familiar que desarrolla una diabetes mellitus, o una paciente con diabetes mellitus a la que se le indican estrógenos (14, 17).

La disbetalipoproteinemia, tiene una prevalencia de 3 a 5 por mil. El defecto genético se expresa clínicamente en menos del 10 por ciento de los casos, requiriendo para ello la asociación con otra condición que altere el metabolismo de las VLDL. Tiene un elevado riesgo de cardiopatía coronaria precoz y de aterosclerosis periférica. Obedece a un déficit de Apo E, o a la presencia de la condición de homocigoto de Apo E2/E2, por lo que existe un defecto de la

captación de remanentes de quilomicrones y de VLDL. Se expresa con una elevación de los triglicéridos y del colesterol total con una relación cercana a 1.

Se identifica por una banda ancha que cubre la zona de beta y prebeta en la electroforesis y en la ultracentrifugación clásica con separación de VLDL, LDL y HDL, el colesterol se encuentra en forma predominantemente en las VLDL. Se asocia a depósitos lipídicos tisulares (xantoma palmar) y frecuentemente, a diabetes mellitus tipo 2 y obesidad (14, 16-18).

Los defectos severos del sistema lipasa lipoproteico, de Apo C2 y la sobreexpresión de Apo C3, se asocian a dislipidemias mixtas con triglicéridos muy elevados (>1000 mg/dL), quilomicrones en ayunas y C-HDL muy bajos. Existe una forma que se expresa en la infancia, se asocia a xantomatosis eruptiva, lipemia retinales y hepatomegalia, que habitualmente no requiere de una condición agregada. Existe una forma de expresión en la edad adulta asociada con alta frecuencia a diabetes mellitus tipo 2, obesidad y alcoholismo. Tanto la forma infantil como la del adulto conllevan un elevado riesgo de pancreatitis aguda necrótica hemorrágica. No existen evidencias concluyentes acerca del riesgo cardiovascular de las formas infantiles, lo que es difícil de demostrar por su baja frecuencia. En cambio, existe acuerdo que las formas del adulto significan un elevado riesgo de cardiopatía coronaria (14, 18).

4. Déficit aislado de HDL

Un nivel de C-HDL igual o inferior a 35 mg/dL significa un factor de riesgo independiente de cardiopatía coronaria. La reducción de los niveles del C-HDL puede resultar de un defecto de la síntesis de Apo A o de una aceleración de su catabolismo por un mayor contenido de triglicéridos, producto de una transferencia desde VLDL cuando éstas están elevadas (14).

Aunque existe el déficit de C-HDL aislado la gran mayoría de los casos se observa en las hipertrigliceridemias aisladas o hiperlipidemias mixtas.

Si bien los defectos genéticos son infrecuentes, se presentan asociados a una cardiopatía coronaria precoz, con niveles de C-HDL bajo 25 mg/dL. La

interrelación entre triglicéridos altos y C-HDL bajos, se expresa a niveles de triglicéridos inferiores a los niveles considerados aceptables para cada categoría de riesgo cardiovascular global y no es infrecuente encontrar un nivel del C-HDL igual o bajo 35 mg/dL y triglicéridos en rangos aceptables (14, 20).

En aquellos casos en que se sospecha una reducción de los niveles de C-HDL dependiente de una alteración del metabolismo de las VLDL, todos los factores ya discutidos, como obesidad, diabetes mellitus tipo 2, consumo excesivo de glúcidos, betabloqueadores, diuréticos tiazidicos pueden estar involucrados en su expresión (21).

C. Diagnóstico en el Laboratorio Clínico

Se basa en los niveles séricos, de las lipoproteínas y de sus lípidos. La determinación cuantitativa de las lipoproteínas es compleja, de tal manera que el diagnóstico se hace con la evaluación de sus lípidos componentes y eventualmente con la identificación semicuantitativa de las lipoproteínas por análisis electroforético (9, 14).

1. Lípidos séricos:

- a. Prueba de quilomicrones: El suero obtenido en condiciones de ayuno (de 12 horas) se deja reposar durante 24 horas a 4° C. Cuando existen quilomicrones aparece un sobrenadante cremoso en su superficie. En condiciones normales esta prueba es negativa (9).
- b. Colesterol total: Su determinación refleja el contenido de colesterol de todas las fracciones lipoprotéicas. Se considera alto un nivel mayor de 240 mg/dL, pero en individuos con riesgo cardiovascular alto o con enfermedad aterosclerótica es anormal un valor mayor de 200 mg/dL (9).

- c. Triglicéridos: Refleja el contenido de triglicéridos de todas las fracciones lipoprotéicas. Se consideran altos valores mayores de 200 mg/dL, pero en individuos con alto riesgo cardiovascular o con patología aterosclerótica, si es mayor de 150 mg/dL.
- d. Colesterol de HDL: La precipitación química de las VLDL, IDL y LDL y la ulterior determinación del colesterol en el sobrenadante, permite cuantificar el colesterol de esta fracción. Los valores anormales son niveles menores de 35 mg/dL y menores de 45 mg/dL en personas con riesgo cardiovascular alto o máximo (9).
- e. Relación Colesterol total / Colesterol HDL (C-total/C-HDL): Utilizando la medición del colesterol total y la del colesterol de HDL, se puede estimar esta relación cuyo valor deseable como índice de riesgo cardiovascular debe ser menor de 4,5 (9).
- f. Determinación semicuantitativa de Colesterol de LDL: Se ha propuesto estimar el colesterol de LDL, utilizando la fórmula de Friedewald.

$$C\text{-LDL} = C\text{-Total} - \left(\frac{\text{Triglicéridos}}{5} \right) + C\text{-HDL}$$

5

Todo ello expresado en mg/dL y siempre que los niveles de triglicéridos sean menores de 400 mg/dL. El C-LDL es considerado el mejor indicador clínico de riesgo cardiovascular y se considera elevado si es mayor de 160 mg/dL en sujetos de riesgo bajo; mayor de 130 en aquellos con riesgo alto; y mayor de 100 en pacientes con riesgo máximo (9).

- g. Electroforesis de Lipoproteínas: Método semicuantitativo que permite identificar la distribución porcentual de las distintas fracciones lipoprotéicas e identificar la aparición de quilomicrones, de remanentes de quilomicrones y de IDL. En el individuo sano, se identifican 3 bandas: betalipoproteínas (LDL),

prebetalipoproteínas (VLDL) y las alfa lipoproteínas (HDL). El predominio porcentual de una de ellas, puede identificar el defecto metabólico. La aparición de una banda en el punto de aplicación corresponde a la presencia de quilomicrones, lo que es patológico en condiciones de ayuno. La aparición de una banda ancha que abarca beta y prebeta es sugerente de un acumulo anormal de IDL y/o de remanentes de quilomicrones (9).

2 Riesgo Cardiovascular Global (RCG)

Se determina considerando en el individuo, los siguientes factores de riesgo:

- Hombre > 45 años
- Mujer > 55 años, sin terapia de reemplazo con estrógenos
- Hipertensión arterial
- Tabaquismo
- Diabetes mellitus
- C-HDL < 35 mg/dL
- Antecedentes familiares de patología vascular en personas jóvenes

Un C-HDL se considera como protector y resta un factor de riesgo.

Con estos elementos se pueden clasificar a los individuos con RCG:

- Bajo = con menos de 2 factores
- Alto = con 2 o más factores
- Máximo = con manifestaciones clínicas de patología aterosclerótica.

Los diabéticos también tienen riesgo máximo.

- La clasificación de RCG condiciona el nivel de anormalidad de los lípidos plasmáticos (9, 10, 20).

D. Fisiopatología de la Aterosclerosis

La enfermedad arterial coronaria (EAC) es una afección de alta prevalencia en las sociedades industrializadas y una de las más importantes causas de

morbilidad y mortalidad en las mismas. El proceso subyacente en la EAC es la aterosclerosis y actualmente se acepta que se trata de una enfermedad inflamatoria crónica de la pared arterial. La presentación clínica más severa de este proceso es el síndrome coronario agudo (angina inestable e infarto [IAM]), que ocurre secundariamente a la oclusión de las arterias coronarias enfermas (22-24).

El desarrollo de las lesiones ateroscleróticas es un proceso que se inicia alrededor de la segunda o tercera décadas de la vida del individuo, y en el que se pueden diferenciar varias etapas, a través de las cuales la composición de la placa aterosclerótica va progresivamente cambiando hasta adquirir la morfología de una placa madura (22).

1. La disfunción endotelial

El primer acontecimiento en el desarrollo de la aterosclerosis es la aparición de la disfunción endotelial (DE). El endotelio desempeña un importante papel en la conservación del equilibrio de la función del lecho vascular. Tiene un papel regulador del tono vasomotor mediante la producción de sustancias vasodilatadoras, como el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI₂), y vasoconstrictoras, como la endotelina 1 y la angiotensina II. Posee, además, propiedades antiaterogénicas (antiagregante, antiadhesiva, antiproliferativa y antioxidante) y antiinflamatorias, segregando sustancias quimiotácticas de monocitos y linfocitos, así como moduladoras del crecimiento vascular (25-27).

Las causas de la DE que favorecen el desarrollo de la aterosclerosis son múltiples, incluyendo entre ellas la presencia de elevados valores de LDL modificadas (LDL-ox, LDL-MM), radicales libres, sustancias inmunorreguladoras (TNF- α IL-1 β , LPS), microorganismos infecciosos (virus *Herpes simplex*, clamidia, citomegalovirus, etc.), alteraciones genéticas; valores séricos elevados de homocisteína, y factores de riesgo clásicos (hipertensión, diabetes, tabaquismo) (26, 27).

La disfunción endotelial conlleva una pérdida de las funciones homeostáticas del endotelio, que resulta en la adhesión de plaquetas y células inflamatorias (monocitos y linfocitos T) a la pared vascular; un aumento de la permeabilidad endotelial que permite el depósito de LDL modificadas a nivel intimal, una liberación de citocinas y factores de crecimiento que producen la proliferación de las células musculares lisas, y la atracción de más células de estirpe inflamatoria a la pared arterial alterada. También trae como consecuencia una perturbación del equilibrio trombolítico-trombótico en el lecho endotelial que promueve el desarrollo de fenómenos trombóticos, así como una regulación anormal del tono vasomotor, secundaria a una menor biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), con la subsiguiente tendencia a la vasoconstricción arterial (28).

El primer cambio histopatológico detectable en las fases iniciales de la aterosclerosis es la acumulación de partículas de LDL en el espacio subintimal. Estas LDL sufren un proceso de oxidación que activa al endotelio favoreciendo el desarrollo de la placa aterosclerótica. Las LDL modificadas (oxidadas) inducen la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y la síntesis de factores quimiotácticos de monocitos y linfocitos (MCP-1) por las células endoteliales. Esto favorece la unión de los monocitos y linfocitos circulantes al endotelio disfuncional y la posterior migración de estas células al espacio subendotelial, promoviendo, al mismo tiempo, la diferenciación de los monocitos a macrófagos. Las LDL oxidadas (LDL-ox) también alteran la producción de radicales libres y NO, favoreciendo el estrés oxidativo en la pared arterial, e incrementan la apoptosis de las células endoteliales (29-32).

Los monocitos atraídos al endotelio disfuncional por los factores quimiotácticos liberados se adhieren al mismo por medio de las moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) expresadas por las células endoteliales dañadas, se internalizan en el espacio subendotelial y maduran a macrófagos, los cuales captan las LDL-ox para transformarse en células espumosas, iniciándose así la formación de la «estría grasa» (28, 29).

Estas células cargadas de lípidos producen radicales libres para la oxidación de más partículas de LDL y liberan nuevas citocinas para la atracción de más

monocitos y linfocitos al endotelio disfuncional y para la migración y proliferación de células musculares lisas en la íntima. Estos procesos autoperpetúan el mecanismo que favorece el desarrollo y la progresión de la placa aterosclerótica (33, 34).

2. Vulnerabilidad de la placa aterosclerótica

Las placas de ateroma son una estructura dinámica, donde existe un equilibrio entre la influencia destructiva de las células inflamatorias y el efecto estabilizante de las células musculares lisas (CML). Estas últimas son las encargadas de sintetizar las proteínas de la matriz extracelular, principal componente de la cubierta fibrosa de las placas ateroscleróticas, que confiere estabilidad a la lesión. En las placas ateroscleróticas existe un equilibrio entre los procesos de síntesis y degradación de colágeno, que están estrechamente controlados por los mediadores de inflamación y regulan el contenido del mismo en las lesiones ateroscleróticas (35).

Las placas vulnerables, con tendencia a la rotura, se caracterizan por presentar un núcleo con un alto contenido lipídico, una elevada infiltración de células inflamatorias (macrófagos y linfocitos T), pocas células musculares lisas y una delgada cubierta fibrosa. Los linfocitos T activados de la placa producen INF- γ , que inhibe la proliferación de la CML y su capacidad de síntesis de colágeno. Los macrófagos activados producen metaloproteasas (gelatinasas, estromelisin y colagenasa intersticial) que degradan las proteínas de la matriz extracelular, favoreciendo la ruptura de la placa, y sintetizan factor tisular (FT), uno de los principales activadores de la cascada de la coagulación, que promueve la trombosis de la placa. Estos macrófagos también inducen la apoptosis de las CML, con la consiguiente disminución de la síntesis de colágeno y debilitamiento de la capa fibrosa que inestabiliza la placa (36-38).

Además de los monocitos, los linfocitos T son igualmente atraídos a la pared arterial disfuncional por sustancias quimiotácticas y allí son activados, iniciando la producción de más citocinas como INF- γ , TNF- α , interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-

8) y factores de crecimiento como el factor estimulador de las colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), que activan a los monocitos presentes en las placas y favorecen su proliferación, potenciando la respuesta inflamatoria local (28, 30, 36).

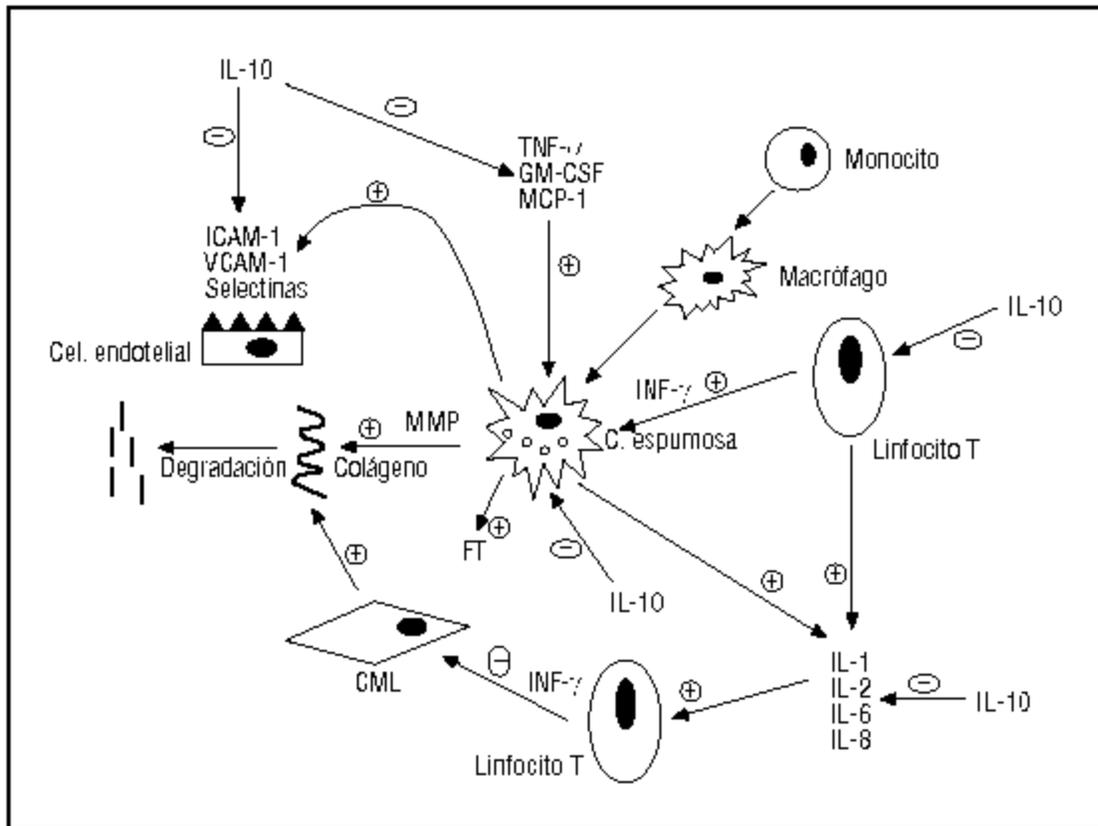
El resultado de la interacción de estos factores es una progresión de la lesión aterosclerótica desde sus estadios iniciales «la estría grasa» hasta la placa aterosclerótica compleja. La ruptura o ulceración de la placa inestable trae como consecuencia la exposición de superficies procoagulantes y protrombóticas a la sangre, que provocan la activación de plaquetas y formación de trombos, que pueden desencadenar complicaciones clínicas al ocluir la luz del vaso o bien producir un crecimiento de la placa de forma asintomática (39, 40).

Así pues, a lo largo de los distintos estadios evolutivos de las lesiones ateroscleróticas pueden ser identificados signos de inflamación crónica, y se han descrito varios mecanismos fisiopatológicos que influyen en el desarrollo, progresión e inestabilización de las lesiones ateroscleróticas (40).

E. La Inflamación y la Aterosclerosis

Tradicionalmente, la aterosclerosis ha sido considerada como una enfermedad por acumulación de lípidos, donde las placas vulnerables eran aquellas con mayor núcleo lipídico y capa fibrosa adelgazada, cuya ruptura respondía a fuerzas de estrés mecánico. Sin embargo, hoy día existen múltiples evidencias científicas que confirman el papel que la respuesta inflamatoria, local o sistémica, desempeña en el desarrollo del proceso aterosclerótico y en el desencadenamiento de acontecimientos cardiovasculares agudos, lo que se presenta en la figura 1 (40).

Fig. 1. Procesos inflamatorios en la aterosclerosis (40).

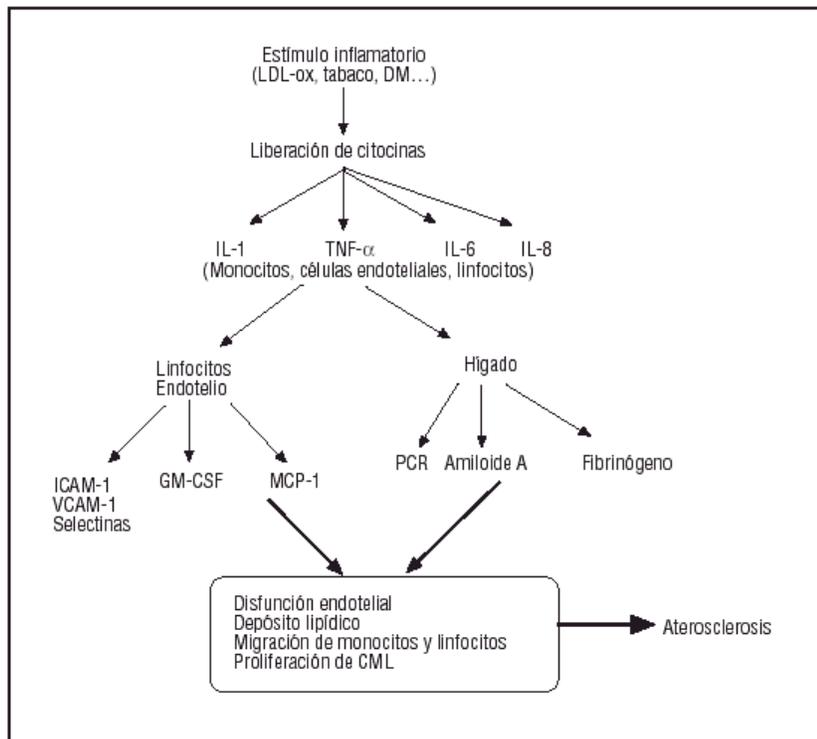


En la placa inestable están presentes linfocitos T y macrófagos activados que segregan citocinas proinflamatorias (INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8), metaloproteasas que degradan la capa fibrosa y factores quimiotácticos de células inflamatorias que promueven la expresión de moléculas de adhesión.

La IL-10 tiene potentes propiedades antiinflamatorias y actúa limitando la respuesta inflamatoria local, lo cual le confiere estabilidad a la lesión aterosclerótica (40).

Los pacientes con angina inestable presentan valores elevados de reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR), amiloide A sérica, fibrinógeno y citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8) (fig. 2).

Fig. 2. Mecanismo de inflamación local o sistémica (40).



La inflamación local o sistémica conduce a la liberación de citocinas, que promueven la síntesis de mediadores inflamatorios que favorecen el desarrollo de la aterosclerosis.

Los valores elevados de estos mediadores de inflamación (PCR, fibrinógeno, amiloide A, IL-6) son marcadores sensibles de inflamación y se correlacionan con el desarrollo de enfermedad arterial coronaria y su severidad, así como con la presencia de acontecimientos coronarios agudos (41-43).

La PCR, además de ser considerada un predictor independiente para el desarrollo de complicaciones cardiovasculares, parece desempeñar un papel en la patogenia de la aterosclerosis, pues ha sido asociada a un incremento del riesgo de trombosis al promover la expresión de factor tisular por los monocitos y activar la cascada del complemento. También se ha observado que promueve la expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales y aumenta la captación de C-LDL por los macrófagos en las placas a través de un proceso de opsonización (41-43).

La IL-6 es una citocina con potentes propiedades proinflamatorias que induce la expresión de reactantes de la fase aguda (mayor inductor de la producción hepática de PCR) y la migración y diferenciación de los macrófagos activados. También contribuye al desencadenamiento de los síndromes coronarios agudos, al potenciar la síntesis de metaloproteasas y la expresión de receptores de LDL en los macrófagos, así como un aumento de la captación de C-LDL y la secreción de sustancias quimiotácticas, como MCP-1, por los mismos. Finalmente, regula la expresión de moléculas de adhesión y citocinas, como la IL-1 β , TNF- α , que incrementan la reacción inflamatoria. Al mismo tiempo, su liberación es estimulada por la IL-1, ambas actúan conjuntamente y con el TNF- α , incrementando la síntesis de IL-8 y reactantes de fase aguda (44).

La IL-1 también induce la expresión de genes para la síntesis de factores activadores del sistema de la coagulación e inhibidores de la fibrinólisis y la migración de neutrófilos al espacio subendotelial, mediada por un aumento de la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y de la producción de GM-CSF (44).

La IL-8 es una citocina proinflamatoria producida por distintos tipos celulares, incluyendo los monocitos-macrófagos y linfocitos T, y su presencia ha sido detectada en las células espumosas en placas de ateroma humano. Se le han asociado propiedades protrombóticas, al incrementar la actividad procoagulante de los monocitos, por aumentar la síntesis y expresión de factor tisular en la superficie de estas células, y propiedades proaterogénicas, al disminuir los valores de TIMP-1 (un inhibidor de las metaloproteasas), lo cual favorece un predominio de los procesos de degradación de la capa fibrosa de la placa sobre los de síntesis (43, 44).

La síntesis de las citocinas proinflamatorias está mediada en gran parte por el factor de transcripción nuclear (NF- $\kappa\beta$). Este está asociado a la inducción de genes codificadores de proteínas, que son vitales para los procesos inflamatorios relacionados con la ruptura de las placas ateroscleróticas. Este factor es activado por diversos estímulos, como citocinas, virus, mitógenos, microorganismos patógenos, LDL modificadas, el estrés oxidativo, etc. La activación de este factor

ha sido detectada tanto en macrófagos como en células endoteliales y CML de las placas ateroscleróticas, y se ha demostrado una correlación directa entre la actividad de NF- κ B y la severidad de las lesiones coronarias. El NF- κ B se encuentra en forma de un heterodímero inactivo en el citoplasma unido a proteínas inhibitoras denominadas genéricamente I κ B, este heterodímero consta de 2 subunidades p50 y p65. Cuando la célula es activada por alguno de los agentes mencionados anteriormente, la I κ B se fosforila y experimenta ubiquitinación, lo cual actúa como «señal» para su degradación proteolítica. Entonces, el dímero p50/65 se transloca al núcleo y allí activa la transcripción de genes diana que inducen la expresión de citocinas (TNF α), interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8), factores de crecimiento (M-CSF, GM-CSF, G-CSF), sustancias quimiotácticas (MCP-1), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) y enzimas (MMP, iNOS, COX-2), que potencian la respuesta inflamatoria local e inestabilizan la placa aterosclerótica (45, 46).

Las células inflamatorias presentes en la placa de ateroma expresan el mediador inmune CD40 y su ligando CD40L. La existencia de células T positivas para el CD40L acumuladas en las placas, principalmente en zonas de rápido crecimiento de la placa y con mayor tendencia a la complicación, sugiere que este ligando interviene en la patogenia del proceso. La interacción del CD40 con su ligando promueve la respuesta humoral y celular. La interrupción de esta unión mediante la administración de anticuerpos anti-CD40L limita, de forma experimental, el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunes, como la nefritis lúpica, la esclerosis múltiple, la tiroiditis y la enfermedad injerto contra huésped. También se ha demostrado *in vitro* que la interacción CD40/CD40L activa funciones relacionadas con la aterogénesis, incluyendo la producción de citocinas proinflamatorias, metaloproteasas, expresión de moléculas de adhesión y factor tisular (47).

F. Papel de la IL-10

La citocina interleucina 10 (IL-10) fue descubierta en 1989. Es una proteína de 35 a 40 kDa y está formada por 160 aminoácidos. Las células Th0 y Th2, que representan subpoblaciones distintas de células T *helper*, células B y monocitos/macrófagos son capaces de sintetizar IL-10. Se ha demostrado que la IL-10 inhibe la síntesis de citocinas por parte de las células Th1. Estas células liberan citocinas como INF- γ , TNF- β e IL-2, las cuales tienden a activar los macrófagos y responder a los antígenos presentados por estas células. Más aún, la IL-10 inhibe la estimulación de las células Th1 por parte de macrófagos y monocitos. Adicionalmente, la IL-10 tiene otros muchos efectos en el sistema monocito/macrófago como la supresión de la producción de las citocinas llamadas inflamatorias IL-1 α , IL-6, IL-8 y GM-CSF. La IL-10 endógena inhibe la síntesis de IL-10 por parte de monocitos/macrófagos mediante un mecanismo *feedback* negativo. La IL-10 no tiene efecto en la producción de TGF- β por parte de monocitos y estimula la expresión de IL-1RA, otra proteína antiinflamatoria. La IL-10 muestra también efectos inmunoestimulantes, en presencia de IL-3 e IL-4, inicia el crecimiento de mastocitos y sus células precursoras. Más aún, la IL-10 dirige la proliferación y diferenciación de las células B en células productoras de anticuerpos. Debido al efecto inhibitorio de la producción de citocinas de la inflamación y a la regulación simultánea de proteínas antiinflamatorias, como IL-1RA, la IL-10 puede tener un papel importante en la regulación de un cierto número de enfermedades diferentes, que incluyen sepsis bacteriana, artritis reumatoide, psoriasis, alergias, preeclampsia y en general procesos inflamatorios.

1. Papel de la IL-10 en la aterosclerosis

Entre las citocinas antiinflamatorias, la IL-10 es considerada la interleucina antiinflamatoria por excelencia. Fue en primer lugar identificada como el factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF), pues actuaba inhibiendo la producción de citocinas por los linfocitos T, particularmente el IFN- γ por las células Th1 en los

sistemas murinos. En ellos, sin embargo, esta inhibición sólo se observaba cuando los macrófagos actuaban como células presentadoras de antígenos (CPA) (46, 47).

Posteriormente se determinó que la IL-10 es, de hecho, una citocina con propiedades pleiotrópicas que actúa sobre diferentes tipos celulares, incluyendo los timocitos, las células T citotóxicas, los mastocitos, las células B y los monocitos-macrófagos (47).

La IL-10 es producida principalmente por un subtipo de linfocitos CD4+ (Th2), y también en grandes cantidades por los macrófagos. Es una citocina con potentes propiedades antiinflamatorias capaz de inhibir importantes funciones de estos dos tipos celulares. Así, se ha descrito que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos y por células T, activadas a través de distintos estímulos (43, 47).

La IL-10 ha sido identificada en fases tempranas y avanzadas de lesiones ateroscleróticas, principalmente localizada en el citoplasma de los macrófagos, aunque también en las CML y en la matriz extracelular (48).

2. Propiedades antiinflamatorias de la IL-10: Mecanismos de acción

Una de las primeras propiedades atribuidas a la IL-10 en sus orígenes fue su capacidad para inhibir la síntesis de citocinas. Se demostró que tanto la IL-10 humana o su recombinante viral añadida a cultivos de monocitos activados por INF- γ y/o LPS, como la producida endogenamente en respuesta a dichos estímulos, era capaz de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, incluyendo la IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ , GM-CSF y G-CSF por los monocitos. Sumado a estos efectos, la IL-10 endógena ejercía un efecto autorregulador sobre su propia producción, reduciendo la síntesis de IL-10 ARNm por parte de los monocitos activados. Además se sabe que del mismo modo podía actuar sobre las células T inhibiendo la producción de IL-2, TNF- β , INF- γ y GM-CSF. También disminuye la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MCH II) por los monocitos/macrófagos, y con ello la

capacidad de los mismos para actuar como células presentadoras de antígeno, limitando, en último término, la respuesta proliferativa antígeno específica de los linfocitos T y, por tanto, la respuesta inflamatoria (47, 48).

Se han propuesto varios mecanismos por los cuales la IL-10 inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias. Uno de los más estudiados es la inhibición de la activación del factor de transcripción nuclear (NF- κ B) por parte de la IL-10 en los monocitos y células T, por medio de un proceso donde intervienen segundos mensajeros del tipo de radicales libres de oxígeno. Esto tiene como resultado una reducción de la síntesis de interleucinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y quimiotácticos de células del sistema inmunológico que limita la respuesta inflamatoria local en la placa. Este mecanismo de acción de la IL-10 difiere del de la IL-4, otra interleucina antiinflamatoria, la cual inhibe igualmente la síntesis de factores proinflamatorios, pero por una vía que no involucra al NF- κ B, sino secundariamente a un aumento de la degradación del ARNm de dicha molécula (48).

Se ha propuesto como otro posible mecanismo para explicar los efectos antiinflamatorios de la IL-10 la inhibición de la producción de interferón mediante la actuación a través de factores de transcripción del grupo STAT.

Paralelamente, se ha demostrado que la IL-10 puede inhibir la expresión de genes proinflamatorios que presentan regiones ricas en elementos AU (ARE), como el TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , GM-CSF, IL-8, etc., desestabilizando su ARNm al actuar sobre estos ARE *motifs* (49, 50).

Además de lo expuesto anteriormente, se ha demostrado que la IL-10 tiene capacidad para inhibir la respuesta de los monocitos mediada por la interacción del CD40-CD40L, la cual parece desempeñar un papel relevante en la aterosclerosis. Han demostrado que el bloqueo *in vivo* de esta interacción mediante anticuerpos, en ratones sometidos a dieta aterogénica, limitaba el tamaño de las placas ateroscleróticas, reducía su contenido lipídico, así como de células T y macrófagos, y disminuía la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1). Así pues, este modelo experimental en animales pone de manifiesto

otro de los mecanismos a través de los cuales la IL-10 parece ejercer un papel protector limitando el desarrollo de la lesión aterosclerótica (32, 50, 51).

3. Modulación de la respuesta inmune celular por IL-10

Se ha observado que las células T participan en la respuesta inmunológica mediante la liberación de citocinas. Dentro de las células T *helper* se distinguen 2 tipos que median respuestas inmunológicas diferenciadas. Las células tipo Th1 producen principalmente IL-2 e INF- γ , que se asocian a la activación de macrófagos y de otros subtipos de células T. Por el contrario, las células Th2 sintetizan fundamentalmente IL-4 e IL-5, que actúan aumentando la respuesta humoral e inhibiendo la respuesta de tipo Th1, que es la que predomina en las placas ateroscleróticas inestables (50).

La IL-10, junto con la IL-12, desempeña un importante papel regulando estos dos tipos de respuesta inmunológica. La IL-12 es un importante factor de crecimiento de las células T, principalmente producida por los monocitos activados y que induce de manera selectiva un patrón de respuesta inmunológica de tipo Th1. Investigaciones han demostrado la presencia de IL-12 en las placas de aterosclerosis. Esta potencia la respuesta inflamatoria crónica de las células T y macrófagos de la placa, lo cual conduce a la inestabilización y ruptura de la misma por diversos mecanismos. Entre ellos está la liberación de INF- γ por las células Th1, que estimula la síntesis de metaloproteasas (MMP) por los macrófagos y produce una disminución de la expresión de genes para la síntesis de colágeno por las CML y un aumento de la apoptosis en dichas células, que inestabiliza finalmente la placa al debilitar la cubierta fibrosa. Además de este papel regulador de la respuesta inmune celular, el INF- γ es capaz de potenciar la expresión de VCAM-1, MHC II y receptores de LDL en las células vasculares (38, 51).

Un trabajo experimental en ratones deficientes en apolipoproteína E demostró que el ARNm de IL-12 se detectaba más precozmente en las placas de aterosclerosis que el ARNm de IL-10, y que la administración diaria de IL-12 aceleraba el desarrollo de aterosclerosis en dichos ratones (32, 40, 42).

Se ha propuesto que la producción endógena de IL-10 por células T y monocitos humanos activados, en respuesta a la estimulación por LDL modificadas, inhibía la producción de IL-12 y, por tanto, facilitaba la respuesta inmune tipo Th2 disminuyendo la respuesta proinflamatoria. Estos hallazgos sugieren que existe, pues, una regulación cruzada en la producción de IL-10 e IL-12 que modula la respuesta inflamatoria local (39, 46, 48).

4. La presencia de IL-10 en las placas de aterosclerosis

La IL-10 ha sido identificada en fases tempranas y avanzadas de lesiones ateroscleróticas, principalmente localizada en el citoplasma de los macrófagos, aunque también en las CML y en la matriz extracelular (47).

Se demostró en humanos no sólo la presencia de IL-10 en placas de aterosclerosis, sino que existía una fuerte asociación entre los altos valores de expresión de IL-10 en las lesiones y una reducción de la expresión de iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible) y de muerte celular en las placas. Esto sugiere que la IL-10 desempeña un importante papel limitando la respuesta inflamatoria local, protegiendo de la excesiva muerte celular en la placa y promoviendo, en consecuencia, su estabilidad (27, 35).

Es sabido que el óxido nítrico (NO) es producido en condiciones normales por las células endoteliales y presenta importantes propiedades vasodilatadoras y antiaterogénicas, al inhibir la agregación plaquetaria, la activación de moléculas de adhesión y la proliferación y migración de las CML. En los estadios iniciales de la aterosclerosis, antes de que aparezcan lesiones angiográficamente visibles, ya está presente la disfunción endotelial, la cual condiciona una biodisponibilidad reducida de NO, ya sea por una disminución de su síntesis o de su liberación o por un aumento de su inactivación. Por el contrario, se promueve la síntesis de su isoforma inducible iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible), y la activación del factor NF- κ B, que promueve la expresión de genes que potencian la respuesta inflamatoria e inestabilizan la placa (39).

En estudios *in vitro* se demostró que la IL-10 endógena ejercía un papel esencial para proteger de la muerte celular a los macrófagos infectados por salmonela, al prevenir la excesiva producción de TNF- α tras la destrucción de la bacteria. El TNF- α ha demostrado ser capaz de inducir muerte celular por apoptosis en distintos tipos celulares, además de ser un importante mediador de efectos inflamatorios (38, 50).

Posteriormente, se demostró que, *in vitro*, la IL-10 podía inhibir la apoptosis de las células T, y que esto era mediado en parte por la sobreexpresión de la proteína Bcl-2, conservando los linfocitos rescatados de la apoptosis su capacidad para proliferar al ser estimulados por la IL-2 (26, 29).

5. La Interleucina-10 y la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica

Se conoce que uno de los principales condicionantes de la inestabilización de las placas ateroscleróticas es la degradación de la matriz extracelular (MEC) y de la cubierta fibrosa de colágeno. Los macrófagos presentes en las placas se encargan de modular el recambio de la MEC, sintetizando y segregando unas enzimas degradadoras de la MEC, denominadas metaloproteasas (MMP), así como sus correspondientes inhibidores (TIMP). Las principales MMP estudiadas son la colagenasa intersticial, la estromelina y las gelatinasas 92 Kd y 72Kd. Estas son sintetizadas inicialmente en forma inactiva y con posterioridad son activadas por diversos estímulos como el estrés oxidativo y las citocinas proinflamatorias. Así mismo, existen 2 tipos de inhibidores de las MMP que son los TIMP-1 y TIMP-2. El TIMP-1 interactúa con las formas activas de la colagenasa y estromelina, al igual que con el precursor y la forma activa de la 92Kd gelatinasa. El TIMP-2 específicamente inhibe la proenzima y la forma activa de la 72Kd gelatinasa (29, 35).

Experimentos *in Vitro* demostraron que la IL-10 ejercía una regulación específica sobre los macrófagos y monocitos, suprimiendo la síntesis de MMP y estimulando en contra la síntesis de su inhibidor, el TIMP-1. Esto sugiere que la IL-10 posee poderosos efectos antiinflamatorios, al contrarrestar las funciones

degradativas de los macrófagos y alterar el balance proteasas/antiproteasas, favoreciendo la preservación de la MEC y cubierta fibrosa, que confiere estabilidad a la placa (22, 28).

6. Regulación de fenómenos protrombóticos: Papel de la IL-10

Uno de los factores importantes que participan en el desencadenamiento del síndrome coronario agudo es la oclusión arterial por un trombo sobrepuesto en una placa aterogénica. Entre los desencadenantes de esta trombosis intravascular está la expresión por parte de las células endoteliales y los monocitos del factor tisular (FT). Este es uno de los principales iniciadores de la cascada de la coagulación *in vivo*, al ligarse al factor VII y favorecer su activación. El complejo formado por el FT/FVIIa activa posteriormente los factores X y IX de la vía final común de la coagulación (28, 30).

El FT no se expresa en las células en condiciones normales, sino como respuesta a varios estímulos, siendo el más efectivo la endotoxina (LPS), pero también las citocinas proinflamatorias (IL-1, MCP-1, factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF) (27).

En 1993, se demostró en experimentos *in vitro* sobre monocitos aislados que la IL-10 tenía un efecto inhibitorio sobre la expresión de TF por dichas células en respuesta a los estímulos mencionados anteriormente, inhibiendo la transcripción del (ARNm) (27, 28).

Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente al observar que la IL-10 mantenía *in vivo* su efecto inhibitorio sobre la expresión de FT por los monocitos cuando era inducida por LPS, actuando también en el ARNm. En otro orden de ideas, en un estudio realizado en humanos, a los que se les inducía endotoxemia de manera experimental, la IL-10 demostró ser capaz de inhibir la activación del sistema de la coagulación al igual que atenuar la fibrinólisis (27, 28).

Lo expuesto anteriormente permite sugerir que la IL-10 podría ser muy útil en el tratamiento de algunas patologías que presentan un riesgo incrementado de

trombosis, por aumento de la actividad procoagulante de los monocitos, como la coagulación intravascular (CID) o la cardiopatía isquémica (27, 28).

7. Evidencias experimentales del papel protector de la IL-10 en la aterosclerosis

La IL-10 es una citocina que presenta un importante papel regulador sobre la respuesta inmune. Su capacidad para inhibir la síntesis de citocinas y diversas funciones celulares de los macrófagos y los linfocitos T la convierte en un agente con poder antiinflamatorio. Si se extrapola este concepto al campo de la aterogénesis, entendida ésta como una enfermedad inflamatoria crónica de la pared vascular, es posible plantear la hipótesis de que esta molécula pudiera ejercer un papel protector en la patogenia de la aterosclerosis (28-30).

Se han realizado múltiples estudios experimentales *in vivo* e *in vitro* en animales, cuyos resultados refuerzan la teoría del papel protector de la IL-10, tanto en la formación como en la estabilización de la placa aterosclerótica. Se demostró que los ratones C57BL/6J deficientes en IL-10 (IL 10^{-/-}) presentaban una susceptibilidad incrementada al desarrollo de lesiones ateroscleróticas comparada con los ratones salvajes (productores de IL-10, IL 10^{+/+}). Además, al estudiar la composición de las placas ateroscleróticas, se observó que, en los ratones IL10^{-/-}, éstas demostraban una mayor infiltración de células inflamatorias, una producción aumentada de IFN- γ (característica de la respuesta tipo Th1) y un menor contenido de colágeno con respecto a las placas de los ratones salvajes, sugiriendo estos hallazgos que se trataban de placas más vulnerables o inestables con alta tendencia a la ruptura (25, 30-32).

Posteriormente, al estudiar el efecto de la transferencia de ADN de IL-10 a los ratones IL-10^{-/-} alimentados con dieta aterogénica se observó que se conseguía una reducción del 60% en el tamaño de las lesiones ateroscleróticas. Por otro lado, se comprobó que en los ratones IL-10^{-/-} sometidos a un ambiente libre de patógenos la superficie total de las lesiones ateroscleróticas era 4-5 veces menor comparada con la de ratones IL-10^{-/-} sometidos a condiciones normales, a pesar

de no hallarse diferencias en su perfil lipídico. Este dato apoya la teoría de la intervención de microorganismos patógenos en el desarrollo de la aterosclerosis (28, 32).

En resumen, este trabajo demostró que la IL-10 tiene un profundo impacto tanto en el desarrollo como en la composición de las lesiones ateroscleróticas, así como un efecto protector contra los patógenos del entorno. Estos hallazgos fueron corroborados posteriormente, al demostrar *in vivo* que los ratones IL-10 transgénicos, que sobreexpresan IL-10 en las células T, al ser alimentados con dieta aterogénica presentan una reducción significativa del desarrollo de lesiones ateroscleróticas, comparados con los ratones salvajes o deficientes en IL-10 sometidos a las mismas condiciones. En estos últimos se observó, además, que presentaban unas lesiones más grandes, con mayor infiltrado inflamatorio y lipídico y una cubierta fibrosa casi inapreciable. Paralelamente, los experimentos *in vitro* de este grupo demostraron que el pretratamiento con IL-10 en estos ratones era capaz de inhibir la interacción de los monocitos, activados por las LDL, con el endotelio y su adhesión al mismo. Esto puede ser en parte explicado por la capacidad de la IL-10 de inhibir la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) por las células endoteliales (32, 40-46).

G. Determinación de los Niveles Séricos de IL-10 en el Laboratorio Clínico

La determinación de IL-10 en el laboratorio puede ser realizada por métodos enzimáticos de unión de antígeno/anticuerpo marcados con diferentes substratos según la metodología que se esté utilizando. Existen pruebas comerciales de laboratorio como EIA o Quimioluminiscencia que son utilizados actualmente para la determinación de la IL-10.

1. EIA

Las pruebas de EIA/ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay por sus siglas en inglés), son ensayos inmunoenzimáticos de unión de antígeno y

anticuerpo. La reacción se lleva a cabo en placas de micropozos los cuales están revestidos con el antígeno o anticuerpo específico que se pone en contacto con el suero en estudio, para evidenciar la reacción se agrega un conjugado cromogénico que luego se hace reaccionar con un substrato que desarrollará la reacción de color y después de un tiempo establecido, se detendrá dicha reacción con una solución de parada (1).

Los resultados son directa o inversamente proporcionales a la concentración del analito que se esté estudiando, según el método de EIA/ELISA que se utilice (1).

2. Quimioluminiscencia

Las reacciones químicas que emiten luz en conjunto con las reacciones biológicas tienen un diverso rango de aplicaciones en los laboratorios clínicos. Las ventajas de la quimioluminiscencia en los ensayos incluyen alta sensibilidad con la detección de cantidades que van hasta picogramos, y alta velocidad en comparación a otros métodos EIA, ya que el resultado es generado en unos pocos minutos y la señal emitida para la lectura de los mismos puede alargarse por la reacción con fosfatasa alcalina que es estable y permite lecturas más exactas (1).

Otra ventaja es que se trabaja sin residuos peligrosos y los procedimientos son más simples. La mayor desventaja de la quimioluminiscencia es que únicamente se puede realizar con equipos automatizados, los cuales no son de fácil acceso (1).

Las moléculas quimioluminiscentes investigadas marcadas incluyen el luminol, isoluminol, ésteres de acridina, tioésteres y sulfaminas, y ésteres de fenantreno. Desde 1983, los métodos de Quimioluminiscencia han sido desarrollados con varios marcadores de enzimas tales como fosfatasa alcalina, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, peroxidasa del rábano, la luciferasa de la renilla, y la xantina oxidasa (1).

En estos últimos años se introdujeron al mercado de la comunidad científica inmunoensayos, los cuales consistían en una fase sólida como método de

separación. Éste grupo de ensayos usan partículas paramagnéticas (PMP) como fase sólida, lo cual le ha generado el nuevo nombre de Electroquimioluminiscencia (1, 43).

IV. JUSTIFICACION

La dislipidemia es un factor de riesgo para que se desarrolle la enfermedad coronaria y aterosclerosis, siendo estas últimas las primeras etapas de enfermedades cardíacas, que producen la muerte de 4,500 a 4,600 personas por año en Guatemala (52). Dado que la enfermedad coronaria se ha convertido en una causa importante de morbimortalidad y es usualmente asintomática en sus estadios tempranos, se convierte en una prioridad identificar lo antes posible este factor de riesgo.

Aunado a esto, la mayor predisposición de algunos pacientes a sufrir eventos cardiovasculares es debida, a la carencia de proteínas antiinflamatorias como la interleucina 10 (IL-10), la cual posee efectos reguladores de respuesta inflamatoria. Esta carencia es la causa de la ruptura de la placa aterogénica dando como resultado la formación de ateromas que provocan la mayoría de infartos y procesos vasculares.

Se han realizado varios estudios, en los que se concluye que pacientes con concentraciones elevadas de interleucina 10 tienen menor predisposición de sufrir procesos cardiovasculares, que aquellos que tienen carencia de esta citocina. Sin embargo hacen falta más estudios acerca de la relación entre la dislipidemia y las concentraciones de interleucina 10, para establecer el papel protector de esta citocina en eventos cardiovasculares.

En Guatemala no hay estudios al respecto, siendo de gran importancia establecer pruebas predictivas, como la determinación de los niveles séricos de interleucina 10, que permitan identificar a pacientes con posible riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Diversos estudios epidemiológicos realizados en el país, han reportado que el 50 % de las personas que fallecen por este tipo de enfermedades no recibió atención médica oportuna (52).

V. OBJETIVOS

A. General

Determinar los niveles séricos de interleucina 10 (IL-10) en pacientes dislipidémicos.

B. Específicos

1. Identificar a los pacientes hipercolesterolémicos a través de la medición de sus niveles séricos de triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL y LDL que asisten a la Casa del Paciente Crónico.
2. Determinación de algún otro padecimiento crónico por medio de una entrevista a los pacientes seleccionados y que consintieron participar en la investigación.
3. Cuantificar la concentración sérica de interleucina 10 (IL-10) en pacientes hipercolesterolémicos que asisten a la Casa del Paciente Crónico.
4. Establecer en porcentaje, el número de pacientes con concentraciones de IL-10 normales y bajas.

VI. HIPOTESIS

La investigación es de tipo descriptivo por lo que no se plantean hipótesis.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de Trabajo

1. Población

Pacientes hipercolesterolémicos (concentraciones de colesterol sérico por encima de 200 mg/dL) que asisten a la Casa del Paciente Crónico.

2. Muestra

La muestra fue de 96 pacientes hipercolesterolémicos (concentraciones de colesterol sérico por encima de 200 mg/dL) que asistieron a la Casa del Paciente Crónico y que cumplieron con los criterios de inclusión. El muestreo fue por conveniencia y por cuota.

B. Recursos

1. Humanos:

Br. Arturo Morales Morales	Tesista
Lic. Guillermo Reyes Del Cid	Asesor

2. Institucionales:

Casa del Paciente Crónico
Laboratorio Clínico Ultralab

3 Materiales

- Jeringas estériles descartables

- Alcohol al 70 %
- Algodón
- Liga de hule para torniquete
- Curitas redondas
- Tubos de vidrio de ensayo de 5 mL
- Gradillas para tubos
- Tips amarillos
- Tips azules
- Descartador plástico de tips
- Papel bond tamaño carta

4. Reactivos

- Agua destilada o desionizada.
- DPC IL-10 Unidades de análisis de (LXP1) con código de barras. Cada una contiene una bola recubierta con anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-10.
- DPC LXP1: 100 unidades.
- DPC IL-10 Vial de Reactivo (LXP2) Con código de barras. 7,5 mL de fosfatasa alcalina (intestino bovino calf) conjugada a anticuerpo monoclonal de ratón anti IL-10 en solución tampón.
- DPC IL-10 Ajustadores (LXP1, LXP2) dos viales (Bajo y Alto) de IL-10 liofilizada en suero matriz no humano.
- DPC LSUBX: Sustrato quimioluminiscente
- DPC LPWS2: Lavado de sonda
- DPC LKPM: Kit de limpieza de sonda
- LXPCM: IMMULITE IL-10 Módulo Control (Dos niveles de control en matriz sintética).
- Reactivo para la determinación de colesterol total HUMAN®.
- Reactivo para la determinación de colesterol HDL HUMAN®.

- Reactivo para la determinación de triglicéridos HUMAN®.
- Control normal y patológico para química Bio-Rad®.
- Control bajo, normal y alto para inmunoensayos Bio-Rad®.
- Control externo para química Prevecal®, España.

5. Equipo

- Pipeta serológica de volúmenes variados
- Equipo automatizado de lectura de quimioluminiscencia IMMULITE®
- Espectrofotómetro Microlab® 300.
- Computadora
- Impresora

6. Selección del paciente

Pacientes con una edad mínima de 18 años, que el médico tratante refirió a la Casa del Paciente Crónico, para realizarles perfil de lípidos como parte de su revisión médica rutinaria. Los pacientes que presentaron hipercolesterolemia, se les informó e invitó a participar en la presente investigación.

Los pacientes que aceptaron participar, se les solicitó firmar la boleta de consentimiento (anexos), después de una entrevista y una explicación verbal del estudio a realizar.

C. Toma de Muestra

Los pacientes se presentaron al laboratorio con un ayuno de 12 a 14 horas. Se extrajo 5 mL de sangre por punción venosa, luego de 15 minutos o hasta que el coagulo de sangre estuviera bien formado, dicha muestra se centrifugó a 1500 rpm para obtener la separación completa del suero. Estos sueros fueron almacenados en tubos de ensayo de vidrio congelados y congelados a 4 grados

Celsius. Descongelándose únicamente el día que dichas muestras fueron analizadas.

1. Procesamiento de muestras

a. Determinación de Triglicéridos

i. Principio

La determinación de los triglicéridos se basa en la hidrólisis enzimática con lipasas, usando como indicador la quinoneimina, formada a partir de la combinación de peróxido de hidrógeno, 4-aminoantipirina y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de peroxidasa. Es una prueba enzimática colorimétrica de punto final.

ii. Procedimiento

En un tubo de ensayo se agregó 1000 µL de reactivo, se añadió 10 µL del suero a analizar, se incubó por 5 minutos a 37 °C y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 546 nm

iii. Cálculos

Para calcular la concentración de triglicéridos se utilizó la siguiente fórmula

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia de Muestra} \times \text{Concentración de Estándar}}{\text{Absorbancia de Estándar}}$$

Se reportó el resultado en miligramos/decilitro (mg/dL)

Valor de referencia: Hasta 150 mg/dL

Paciente dislipidémico: Mayor de 150 mg/dL

b. Determinación de Colesterol Total

i. Principio

La determinación del colesterol se basa en la hidrólisis enzimática y la oxidación. El indicador utilizado es la quineimina, formada por la combinación del peróxido de hidrógeno y 4-aminoanipirina en presencia de fenol y peroxidasa. Es una prueba enzimática colorimétrica de punto final.

ii. Procedimiento

En un tubo de ensayo se agregó 1000 µL de reactivo, se añadió 10 µL del suero a analizar, se incubó por 5 minutos a 37 °C y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 546 nm.

iii. Cálculos

Para calcular la concentración de colesterol total se utilizó la siguiente fórmula

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia de Muestra} \times \text{Concentración de Estándar}}{\text{Absorbancia de Estándar}}$$

Se reportó el resultado en miligramos/decilitro (mg/dL)

Valor de referencia: Hasta 200 mg/dL

Paciente dislipidémico: Mayor de 200 mg/dL

c. Determinación de Colesterol HDL

i. Principio

Las lipoproteínas de baja densidad y de muy baja densidad son precipitadas del suero o plasma, con el reactivo de sulfato de magnesio/dextrán sulfato, según la metodología de Finley (12).

ii. Procedimiento

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son determinadas en el fluido sobrenadante, de la siguiente manera. A 500 µL de suero se adicionaron 50 µL de reactivo precipitante de HDL, se mezcló e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó por 10 minutos a 1000 rpm y se separó el sobrenadante. Se utilizó una prueba enzimática colorimétrica de punto final. En un tubo de ensayo se agregaron 1000 µL de reactivo de colesterol y se añadió 25 µL del sobrenadante a analizar, obtenido del paso anterior, se incubó por 5 minutos a 37 °C y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 546 nm.

iii. Cálculos

Para calcular la concentración de colesterol HDL fue utilizada la siguiente fórmula

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia de Muestra} \times \text{Concentración de Estándar}}{\text{Absorbancia de Estándar}}$$

Se reportó el resultado en miligramos/decilitro (mg/dL)

Valor de referencia: Mayor de 45 mg/dL

Paciente dislipidémico: Menor de 45 mg/dL

d. Determinación de Colesterol LDL

Para la determinación semicuantitativa de Colesterol de LDL se utilizó la fórmula de Friedewald (12).

$$\text{C-LDL} = \text{C-Total} - \frac{(\text{Triglicéridos})}{5} + \text{C- HDL}$$

5

Todo ello expresado en mg/dL y siempre que los niveles de triglicéridos sean menores de 400 mg/dL.

El C-LDL es considerado el mejor indicador clínico de riesgo cardiovascular y se considera elevado si es mayor de 160 mg/dL en sujetos de riesgo bajo; mayor de 130 en aquellos con riesgo alto; y mayor de 100 en pacientes con riesgo máximo.

e. Determinación de Interleucina 10

Las muestras de los paciente hipercolesterolémicos fueron analizadas para determinar los niveles séricos de interleucina 10, en el equipo IMMULITE 1 DPC y la metódica utilizada fue un ensayo inmunométrico quimioluminiscente marcado enzimáticamente en fase sólida, siendo los valores de referencia reportado en el inserto del reactivo para éste método de 5 a 9.1 pg/mL (54).

3. Control de Calidad

Para la cuantificación del colesterol total en las muestras se utilizó un Microlab-300[®] que fue calibrado con el estándar incluido en el kit de reactivos. Los niveles de IL-10 de las muestras fueron determinados con un equipo de quimioluminiscencia INMMULITE[®] utilizándose para su calibración los calibradores incluidos en el kit comercial.

Se realizó el control de calidad interno tanto para las pruebas enzimáticas como para inmunoensayos. Los resultados obtenidos fueron ingresados al programa informático interno de Ultralab. Si los resultados de los controles internos cumplían con las reglas de Westgard 1-2s (una observación de control fuera de los límites de 2 desviaciones estándar) y 4-1s (4 valores consecutivos del mismo lado de la media, independiente de las desviaciones estándar específicas en la que se localicen) los resultados de las corridas de muestras se aceptaron, de no ser así, se debió calibrar los equipos hasta lograr que pasaran los controles de calidad.

El coeficiente de variación (CV) intraensayos para el colesterol total fue de 4.3% para el suero normal y de 3.8% para el suero patológico. En el caso de la

IL-10 el CV fue de 7.1% para el suero normal y de 8.8 % para el suero patológico. Dichos CV se encuentran entre las dos desviaciones estándar permitidas según el fabricante. El fabricante presenta CV teóricos de 4.2 % hasta 9.9 % a diferentes concentraciones, según los insertos que vienen en el kit comercial.

Como control de calidad externo se utilizó Prevecal®, para evaluar el desempeño y la exactitud de la pruebas, siendo este control de tipo mensual y teniendo una duración un año, los resultados obtenidos se utilizaron para realizar medidas correctivas en caso en el que fueron necesarias. Los resultados obtenidos del control externo fueron satisfactorios, no mostrando tendencias ni errores sistémicos en el tiempo que se llevó a cabo el estudio.

4. Diseño de la Investigación

La investigación fue de tipo descriptivo no probabilístico por cuota, el tamaño de la muestra se estableció a conveniencia.

a. Criterios de Inclusión

Pacientes hipercolesterolémicos (concentraciones de colesterol sérico por encima de 200 mg/dL), con una edad mínima de 18 años, que asistieron a la Casa del Paciente Crónico, sin importar si toman medicamento y que den su consentimiento por escrito para realizar el estudio.

b. Criterios de Exclusión

- Pacientes dislipidémicos pero no hipercolesterolémicos.
- Que no aceptaron que se les realice el estudio según la boleta de consentimiento.
- Menores de 18 años de edad.

c. Análisis de Resultados

Se determinó los niveles séricos de IL-10 en una muestra de 96 pacientes hipercolesterolémicos, obtenida por un muestreo a conveniencia, debido al costo y la cantidad de reactivo disponible para realizar la investigación.

Los resultados de las concentraciones séricas en mg/dL para el colesterol total y en pg/mL para los niveles de IL-10, fueron presentadas en tablas.

Además la concentración de IL-10 así como la clasificación de la respuesta (normal o baja) se mostró en porcentaje a través de gráficas estadísticas.

También se presentaron la frecuencia y el porcentaje de otras variables tales como género, edad y padecimiento de alguna otra enfermedad crónica diferente a la dislipidemia. No se llevó a cabo ninguna comparación entre hipercolesterolemia y niveles séricos de IL-10, por no ser parte de los objetivos del estudio.

d. Aspectos éticos de la investigación

Se desarrolló una boleta de consentimiento del paciente para ser sometido al estudio, donde se le explicó la metodología de toma de muestra, la importancia de realizar el estudio tanto para él, por la situación de riesgo que presenta, como para la población guatemalteca en general por los resultados que de la investigación se obtengan.

A los pacientes que se sometieron al estudio se les entregaron los resultados obtenidos y con ellos pudieron asistir con el cardiólogo de la institución para la interpretación de los mismos y las medidas que éste considere pertinentes según cada caso en particular.

VIII. RESULTADOS

Se determinó el nivel sérico de Interleucina 10 (IL-10) por el método de quimioluminiscencia en 96 pacientes que asistieron a la Casa del Paciente Crónico y que aceptaron voluntariamente participar en el estudio, llenando y aceptado lo descrito en la boleta de consentimiento que se diseñó para la presente investigación. La distribución de pacientes por género se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de pacientes por género (n = 96)

Género	Frecuencia	Porcentaje
Masculino	61	64%
Femenino	35	36%
Total	96	100%

Fuente: Datos experimentales

El promedio de los niveles séricos de colesterol por género fueron de 243.8 mg/dL para hombres con una desviación estándar de 28.4 mg/dL, para mujeres el promedio fue de 241.1 mg/dL, con una desviación estándar de 27.8 mg/dL (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de pacientes según niveles de colesterol (n = 96)

Niveles de Colesterol (mg/dL) ^a	Frecuencia	Porcentaje
231-240	11	11%
241-250	20	21%
251-260	30	31%
261-270	25	26%
271-280	10	10%
Total	96	100%

a: Miligramos por decilitros

Fuente: Datos experimentales

La frecuencia de pacientes según edad se presenta en la Tabla 3. Se observa que todos los pacientes participantes al momento de realizarse la investigación eran mayores de 18 años, siendo el de menor edad un hombre de 31 años y el de mayor edad un hombre de 73 años.

Tabla 3. Frecuencia de pacientes según edad (n = 96)

Edad (Años)	Frecuencia	Porcentaje
31 A 40	15	16%
41 A 50	15	16%
51 A 60	46	48%
61 A 70	15	16%
71 A 80	5	5%
Total	96	100%

Fuente: Datos experimentales

Se evaluó a través de entrevista a todos los pacientes si tenían algún padecimiento que fuera predisponente de afecciones cardiacas adicional a la hipercolesterolemia o que tengan relación con los niveles de IL-10. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Frecuencia de pacientes que presentaron enfermedades adicionales a la hipercolesterolemia (n = 96)

Enfermedad	Frecuencia	Porcentaje
Diabetes	21	22%
Hipertensión	25	25%
Alergia	15	16%
2 ó más enfermedades	20	21%
Ninguna	15	16%
Total	96	100%

Fuente: Datos experimentales

De la revisión de los datos reportados en la boleta de consentimiento se obtuvo la información de enfermedades adicionales a la hipercolesterolemia y que constituyen otro factor de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares, dichos datos se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Frecuencia de pacientes que presentaron dos o más enfermedades (n = 20)

Enfermedades	Frecuencia	Porcentaje
Hipertensión, Alergia y Artritis	5	25%
Hipertensión y Alergia	10	50%
Diabetes e Hipertensión	5	25%
Total	20	100%

Fuente: Datos experimentales

Como se observa en la Tabla 6, el 93% de los pacientes evaluados presentaron concentraciones séricas bajas de IL-10.

Tabla 6. Frecuencia de pacientes según niveles séricos de IL-10 (n = 96)

Nivel Sérico de IL-10	Pacientes	Porcentaje
Concentración baja (Menor de 5 pg/mL ^a)	89	93%
Concentración Normal (Igual o Mayor a 5 pg/mL)	7	7%
Total	96	100%

a: Picogramos por mililitros

Fuente: Datos experimentales

Tabla 7. Frecuencia de pacientes con niveles séricos bajos de IL-10 (menores de 5 pg/mL) (n = 89)

Niveles Séricos de IL-10 pg/mL ^a	Pacientes	Porcentaje
0.0-0.99	33	37%
1.0-1.99	30	34%
2.0-2.99	21	24%
3.0-3.99	3	3%
4.0-4.99	2	2%
Total	89	100%

a: Picogramos por mililitro

Fuente: Datos experimentales

Tabla 8. Frecuencia de pacientes con niveles séricos normales de IL-10 (igual o mayor de 5 pg/mL) (n = 7)

Niveles Séricos de IL-10	Pacientes	Porcentaje
6.0-6.99	4	57%
>9.00	3	43%
Total	7	100%

Fuente: Datos experimentales

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Un informe del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), indica que la tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, es más elevada en personas de 45 a 55 años, por esta razón resulta de suma importancia evaluar al grupo anteriormente descrito por medio de marcadores predictivos de inflamación conjuntamente con los demás factores de riesgo cardiovascular global que se describen en la presente investigación (9, 10, 52).

En este estudio los pacientes que aceptaron participar y firmaron la boleta de consentimiento, fueron 61 (64 %) hombres y 35 (36 %) mujeres.

Únicamente fueron tomados en cuenta los pacientes con niveles de colesterol total superior a 200 mg/dL, por lo que los resultados de los otros componentes lipémicos como triglicéridos, colesterol HDL o colesterol LDL no se consideraron parte del criterio de inclusión de la investigación, aunque si fueron reportados a los pacientes para seguimiento médico o tratamiento.

Todos los pacientes evaluados fueron mayores de 18 años, estando el mayor porcentaje (47.92 %) entre el rango de 51 a 60 años. Es importante mencionar que el riesgo de padecer enfermedad arterial coronaria y el proceso subyacente de aterosclerosis aumenta con la edad, iniciándose a partir de los 45 años en hombres y a los 55 años en mujeres, estas últimas tienen un riesgo mayor si no reciben terapia de reemplazo con estrógenos (9, 10, 20, 52).

Solamente 15 pacientes (16 %) reportaron en la encuesta no padecer ninguna enfermedad adicional a la hipercolesterolemia, lo que indica que los 81 pacientes (84 %) restantes tienen algún otro factor de riesgo adicional predisponente para el padecimiento de enfermedades cardiovasculares, siendo el más frecuente la hipertensión que fue reportada por 25 (26 %) pacientes además de los 20 (21 %) pacientes que mencionaron padecer dos o más enfermedades, ya que todos estos la incluyeron en sus padecimientos.

Con respecto a la IL-10, sabemos que inhibe la síntesis de citocinas por parte de las células Th1. Estas células liberan citocinas como INF- γ , TNF- β e IL- 2, las cuales tienden a activar los macrófagos y responder a los antígenos presentados

por estas células. Más aún, la IL-10 inhibe la estimulación de las células Th1 por parte de macrófagos y monocitos. Adicionalmente, la IL-10 tiene otros muchos efectos en el sistema monocito/macrófago como la supresión de la producción de las citocinas llamadas inflamatorias IL-1 α , IL-6, IL-8 y GM-CSF. De esta forma, mayores concentraciones de IL-10 disminuyen de manera significativa el riesgo de padecer procesos inflamatorios (30,40).

El presente estudio mostró niveles séricos de IL-10 por debajo del valor normal establecido por el fabricante del reactivo y método utilizados (menor de 5 pg/mL) en 89 (92,71 %) pacientes hipercolesterolémicos, siendo éstos teóricamente los que presentan mayor riesgo de desarrollar daño aterosclerótico debido a una reacción inflamatoria, se sabe que la IL-10 tiene potentes propiedades antiinflamatorias y actúa limitando la respuesta inflamatoria local, confiriéndole estabilidad a la lesión aterosclerótica, evitando que el desenlace pueda ser entre otras afecciones el daño coronario y la muerte (30, 40). Únicamente 7 pacientes (7,29 %) tuvieron un nivel sérico de IL-10 en el rango normal (5,0 a 9,1 pg/mL).

Es importante hacer notar que los valores de referencia para la determinación de los niveles séricos de IL-10 pueden variar dependiendo de los diferentes métodos EIA utilizados para su cuantificación (55).

Se ha reportado que en otros procesos inflamatorios como diabetes, alergias o enfermedades reumatoides los niveles de IL-10 se encuentran disminuidos (27, 35, 50).

En esta investigación no se correlacionó los niveles séricos bajos de IL-10 con las enfermedades anteriormente mencionadas, ya que la información del padecimiento de las mismas en los pacientes fue obtenida mediante entrevista y no se confirmaron mediante pruebas de laboratorio, además de no ser parte de la investigación.

En el presente estudio no hubo un grupo etéreo por género o edad predominante que mostrara una mayor incidencia de niveles séricos por debajo del valor normal de IL-10. Además no se encontró una correlación entre niveles más altos de colesterol con niveles más bajos de IL-10.

Los resultados, tanto de colesterol como de IL-10, se obtuvieron realizando las pruebas respectivas durante un mes. Estas fueron aceptadas debido a que los valores de los controles de calidad interno para las dos pruebas cumplieron con las reglas de Westgard establecidas en el presente trabajo. Esto se puede observar en las gráficas de Levey Jennings de ambos analitos que se adjuntan en los anexos. El coeficiente de variación (CV) intraensayos para el colesterol total fue de 4.3% para el suero norma y de 3.8% para el suero patológico, siendo el CV reportado por el fabricante de 1.62% y de 1.14% respectivamente.

En el caso de la IL-10 el CV fue de 7.1% para el suero normal y de 8.8 % para el suero patológico, reportando el inserto de la metódica proporcionado por el fabricante, un valor teórico de CV de 4.8% y de 4.2% respectivamente.

Estas variaciones entre los valores de CV experimentales y los teóricos se pueden deber entre otras cosas al envejecimiento de los reactivos, condiciones de manejo y almacenamiento de los mismos, sin embargo no es posible afirmar con certeza las causas de variabilidad teórico-experimentales.

Con base a los resultados presentados en este estudio, se puede decir que la determinación de niveles de IL-10 puede ser implementada de forma rutinaria como un marcador predictivo de procesos inflamatorios y más específicamente, de enfermedad coronaria si está asociado a hipercolesterolemia.

X. CONCLUSIONES

- a. El 92,71 % de los pacientes tuvieron su nivel sérico de IL-10 por debajo del valor normal de 5 pg/mL, siendo éstos teóricamente los que podrían presentar mayor riesgo de desarrollar daño aterosclerótico asociado a una reacción inflamatoria.
- b. La determinación de niveles de IL-10 puede ser implementado de forma rutinaria como un marcador predictivo de procesos inflamatorios y más específicamente de enfermedad coronaria si está unido a hipercolesterolemia.
- c. El 84 % de los pacientes evaluados reportaron padecer algún otro factor de riesgo predisponente adicional a la hipercolesterolemia para el padecimiento de enfermedades cardíacas, siendo la más frecuente la hipertensión.

XI. RECOMENDACIONES

- a. Realizar investigaciones para evaluar otros posibles marcadores de inflamación como la IL-6 en pacientes con riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.
- b. Determinar los niveles de IL-10 en una población guatemalteca sana con el fin de establecer los valores de referencia para el país.
- c. Hacer un estudio comparativo determinando los niveles de IL-10 en una población sana y una con padecimientos de procesos inflamatorios para establecer la diferencia entre ambas poblaciones.
- d. Evaluar los niveles séricos de de IL-10 en pacientes con otras enfermedades que se relacionen con procesos inflamatorios, para determinar su utilidad diagnóstica o predictiva.
- e. Apoyar la investigación para la evaluación de nuevas pruebas diagnósticas que sean de fácil implementación en los laboratorios clínicos guatemaltecos y que puedan ser realizadas de forma rutinaria en los mismos.

XII. REFERENCIAS

1. Pérez R, Kasaki JC. Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Rev. Esp. Cardiol* 2002; 55:738-750.
2. Verbeuren TJ, Coene MC, Jordaens FH, Van Hove CE, Zonnekeyn LL, Herman AG. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the human. *Circ Res* 1986; 58:496-504.
3. Ross R, Macal H, Glenn M, Christensen A. Atherosclerosis - An inflammatory acute disease . *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
4. Robbins M, Topol E. Inflammation in acute coronary syndromes. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 2001; p. 130-142.
5. Glasser SP, Selwyn AP, Ganz P, Virchow N, Grossmann W. Atherosclerosis: Risk factors and the vascular endothelium. *Am Heart J* 1996; 131:379-84.
6. Davies MJ. Stability and instability: the two faces of coronary atherosclerosis: The Paul Dudley White Lecture, 1999. *Circulation* 2000; 93:1354-63.
7. K, O'Garra A, De Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Ann Rev Immunol* 1993; 11:165-90.
8. Ridker PM, Cushman M, Stamper MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336:973-9.
9. Ochoa, L. Las Dislipidemias. *Apuntes de Fisiopatología de Sistemas, Escuela de Medicina, Argentina, 2001.*
10. Stamper MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336:973-9.
11. Albin RJ, Senior RM, Welgus HG, Connolly NL, Campbell EJ. Human alveolar macrophages release an inhibitor of metalloproteinase elastase in vitro. *Am Rev Respir* 1997; 135:1281-5.

12. Plaza I, *et al.* Control de la colesterolemia en España 2000. Un instrumento para la prevención cardiovascular. *Rev. Esp. Cardiol* 2000; 53:815-837.
13. Clinton SK, Fleet JC, Loppnow H, Salomon RN, Clark BD, Cannon JG, *et al.* Interleukin-1 gene expression in rabbit vascular tissue in vivo. *Am J Pathol* 1991; 138:1005-14.
14. Panagiotis K, Chai H. Defensins and cathelicidins: Neutrophil peptides with roles in inflammation, hiperlipidemia and atherosclerosis, *J. Cell. Mol.Med.* Vol , No. 1, 2005 p 3-10.
15. Arteaga A., Velasco N.: Dislipidemias. *Bol. Esc. Medicina. P. Univ. Católica* 2001 ; 20 : 88 – 93.
16. Grundy S: Atherogenic dyslipidemias. Lipoprotein abnormalities and implication for therapy. *Am J Cardiol.* 1995 ; 75 : 45B - 52B.
17. Holme I: Cholesterol reduction and its impact on coronary artery disease and total mortality. *Am J Cardiol.* 1995 ; 76 (suppl) : 10C - 17C.
18. Cohen SB, Crawley JB, Kahan MC, Feldmann M, Foxwell BM. Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with upregulation of Bcl-2. *Immunology* 2001;17: 145-50.
19. Bonow R., Bohanon N., Hazzard W: Risk stratification in coronary artery disease and special population. *Am J Med.* 1996; 101 : 4A - 17A.
20. National Cholesterol Education Program (NCEP). Summary of the Second Report. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment Panel II) *JAMA* 2003; 264: 3015 – 3023.
21. International lipid information bureau (ILIB) In. The ILIB handbook for clinical practice. Blood lipids and clinical practice. Ed. Gotto A. ILIB Pub. Houston U.S.A. 1995.
22. Xavier HT. Dislipidemia y Trombosis: una importante asociación de riesgo para la inestabilización de la placa aterosclerótica. Editado por la Revista de la Sociedad de Cardiología del Estado de São Paulo, Brasil 2002; 12(4):606-12.

23. Braunwald E. Shattuck Lecture-cardiovascular medicine at the turn of the millennium: trumps, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* 1997; 337:1360-9.
24. Kannel WB, Wilson PWF. An update on coronary risk factors. *Med Clin North Am* 1995;79(5):951-71.
25. Moreno PR, Fallon Jt. Inflammation in acute coronary syndromes. En: Schultheiss H, Schwimmbeck P, editors. *The role of immune mechanism in cardiovascular disease*. Berlin: Springer, 1997; p. 213-29.
26. Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 1998;105:32S-9S.
27. Toro H. La asociación de dislipidemia y trombosis en la inestabilización de la placa aterosclerótica. *Rev. Cubana Invest Biomed* 2005;24(3).
28. Braunwald E, Fuster V. Unstable angina. Definition, pathogenesis, and classification. En: Fuster V, Toss R, Topol EJ, editors. *Atherosclerosis and coronary disease*. Philadelphia: JB Lippincot, 1999; p. 1285-98.
29. National Cholesterol Education Program (NCEP). Highlights of the report of the expert Panel on blood cholesterol levels in children and adolescent. US Department of Health and Human Services NIH pub 91 - 2731; 2001, Washington D.C.
30. Hasson GK, Holm J, Kral JG. Accumulation of IgG and complement factor C3 in human arterial endothelium and atherosclerotic lesions. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2000;92A: 429-35.
31. Roselaar SE, Schonfeld G, Daugherty A.. Enhanced development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by suppression of cell-mediated immunity. *J Clin Invest* 2003; 96:389-94.
32. Emeson EE, Shen ML. Accelerated atherosclerotic in hyperlipidemic C57BL/6 mice treated with cyclosporin A. *Am J Pathol* 2003;142:1906-15.
33. Muntaner A, Lucardi H. Atherosclerosis ¿por qué una enfermedad inflamatoria?. *Rev. Fed. Arg. Cardiol* 28:201-216, 1999.

34. Barath P, Fishlein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Card* 2000; 65:297-302.
35. Amirbekian V. Molecular Imaging of vulnerable atherosclerotic plaques. *Special Molecular Imaging, Medical Solution*. 2005 p 39-49.
36. Seino Y, Ikeda U, Ikeda M, Yamamoto K, Misawa Y, Hasegawa T, *et al*. Interleukin-6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine* 2004; 6:87-91.
37. Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T. Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherosclerosis. *Virchows Arch* 2003; 423:433-42.
38. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arteriosclerotic Thrombotic Vascular Biology* 1997; 17:1859-67.
39. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101:948-54.
40. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlyger H, Just H. Modulation of coronary vascular tone in humans: progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 2001; 83:391-401.
41. Van der Wal AC, Becker AE, van der Loss CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion at thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 2004;89:36-44.
42. Lüscher TF, Vanhoutte PM. *The Endothelium: modulator of cardiovascular function*. Boca Raton: CRC Press, 2000.
43. Moncada S, Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *N Engl J Med* 1999;300:1142-7.
44. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 2000;323:27-36.

45. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1990; 288:373-6.
46. Liao JK. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998;44:1799-808.
47. Drexler H. Endothelium dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;4:287-324.
48. Simon A, Castro A, Kaski JC. Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:211-7.
49. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993;9:2546-51.
50. Vogel RA. Cholesterol lowering and endothelial function. *Am J Med* 1999;107:479-87.
51. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, *et al.* Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001;104:191-6.
52. Ardón F. Mortalidad causada por enfermedades cardiovasculares. La 34 Semana Epidemiológica en Guatemala, doc tec, del MSPAS Guatemala 2005.
53. Cooper WG. Lecciones Básicas de Control de Calidad en el Laboratorio, Bio-Rad Laboratorios, Inc. Clinical Diagnostics Group. Doc. Tec. USA, 2002;21-26.
54. Diagnostic Products Corporation, IMMULITE® 1000 systems, IL-10, UNited Kingdom, 2006.
55. Dominguez M. C, Lorenzo N. Caracterización de Moléculas HLA tipo II y evaluación de citocinas en pacientes cubanos con Artritis Reumatoide. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Servio Nacional de Reumatología. Hospital Clínico Quirúrgico de 10 de Octubre. *Rev Cubana de reumatología*, 2006.

XIII. ANEXOS

Boleta de consentimiento del paciente que será sometido al estudio.

Determinación de niveles séricos de interleucina 10

Lugar y fecha: _____

APROBACION:

Yo _____, después de escuchar y entender claramente la importancia que para mí y la población tiene la realización de esta prueba de laboratorio, doy mi consentimiento para ser incluido dentro del estudio de determinación de niveles séricos de Interleucina 10 en pacientes dislipidemicos.

Datos Básicos:

Fecha de Nacimiento: _____

Peso: _____ Lbs. Talla: _____ Cms.

Sexo: M F Edad: _____ Años

Diabético: SI NO No sabe

Hipertenso: SI NO No sabe

Artritis Sepsis Alergias Otros: _____

Fecha de recolección de la Muestra: _____

Concentración sérica de triglicéridos: _____ (Menor a 150 mg/dL)

Concentración sérica de colesterol total: _____ (Menor a 200 mg/dL)

Concentración sérica de colesterol HDL: _____ (Mayor a 45 mg/dL)

Concentración sérica de colesterol LDL: _____ (Menor a 150 mg/dL)

Niveles séricos de Interleucina 10: _____ (5 a 9.1 pg/mL)

OBSERVACIONES: _____

Firma _____ Cedula _____

En los gráficos No. 9, 10, 11 y 12 se muestran los resultados de control de calidad interno que validaron las corridas de las muestras de la presente investigación.

Gráfico 9 Curva de Levey Jennings del control normal de colesterol total

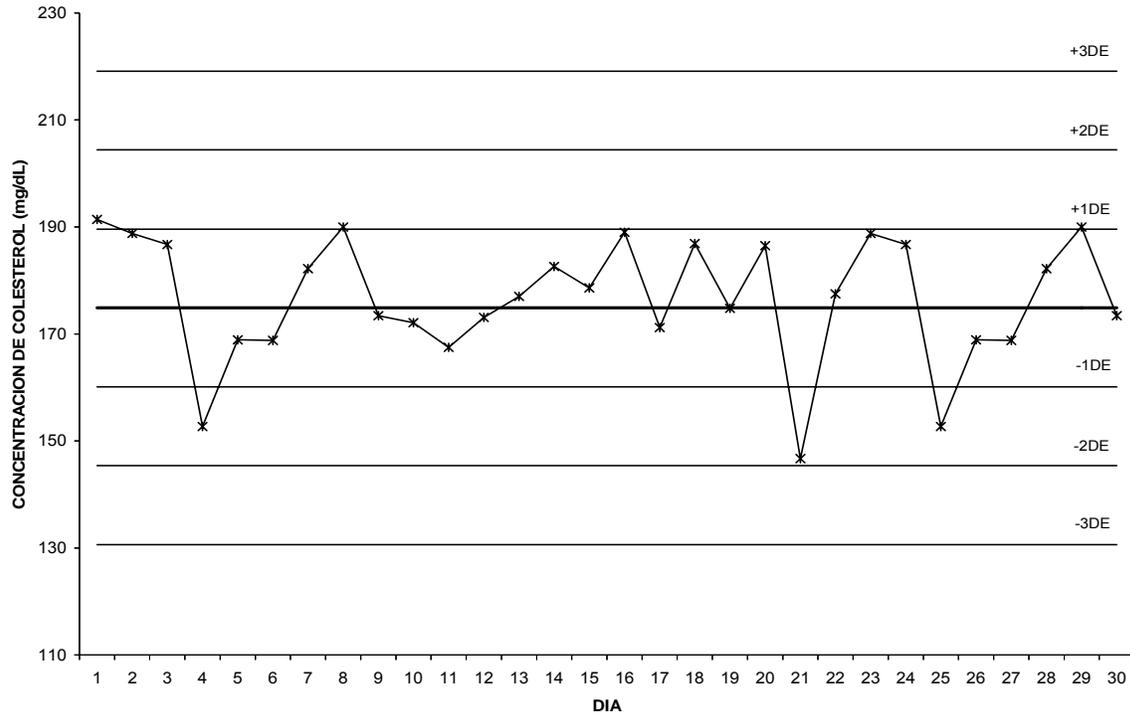


Gráfico 10 Curva de Levey Jennings del control patológico de colesterol total

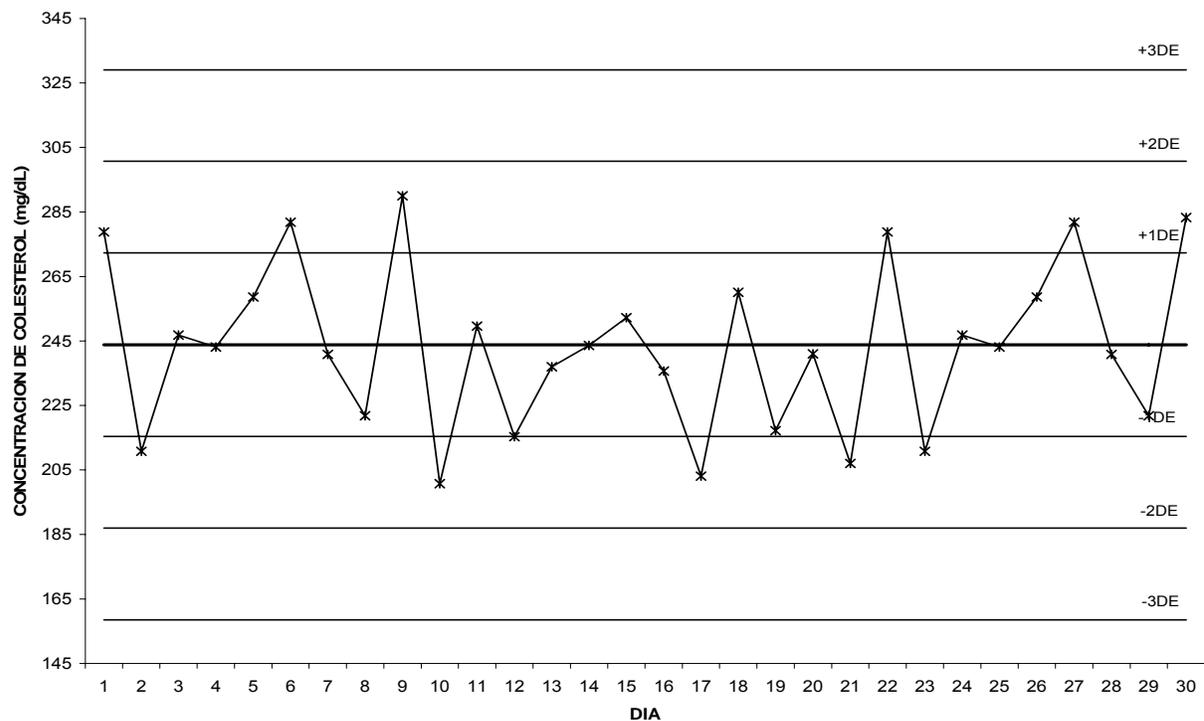


Gráfico 11 Curva de Levey Jennings del control patológico de IL-10

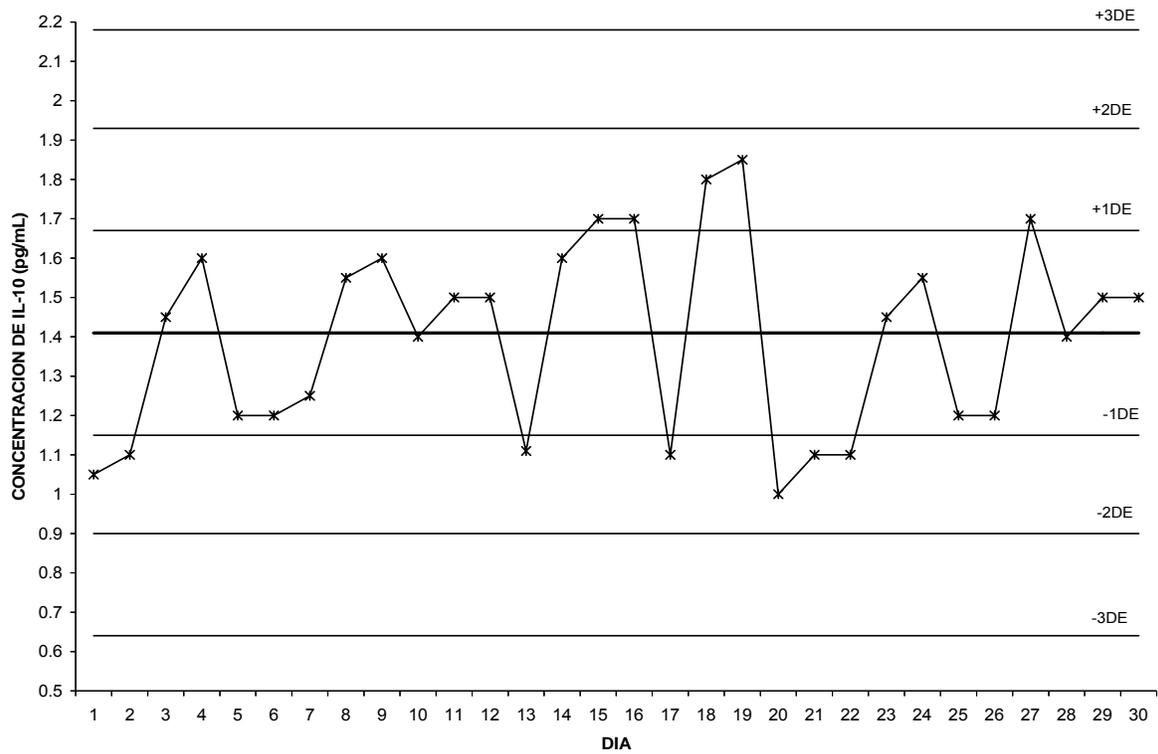
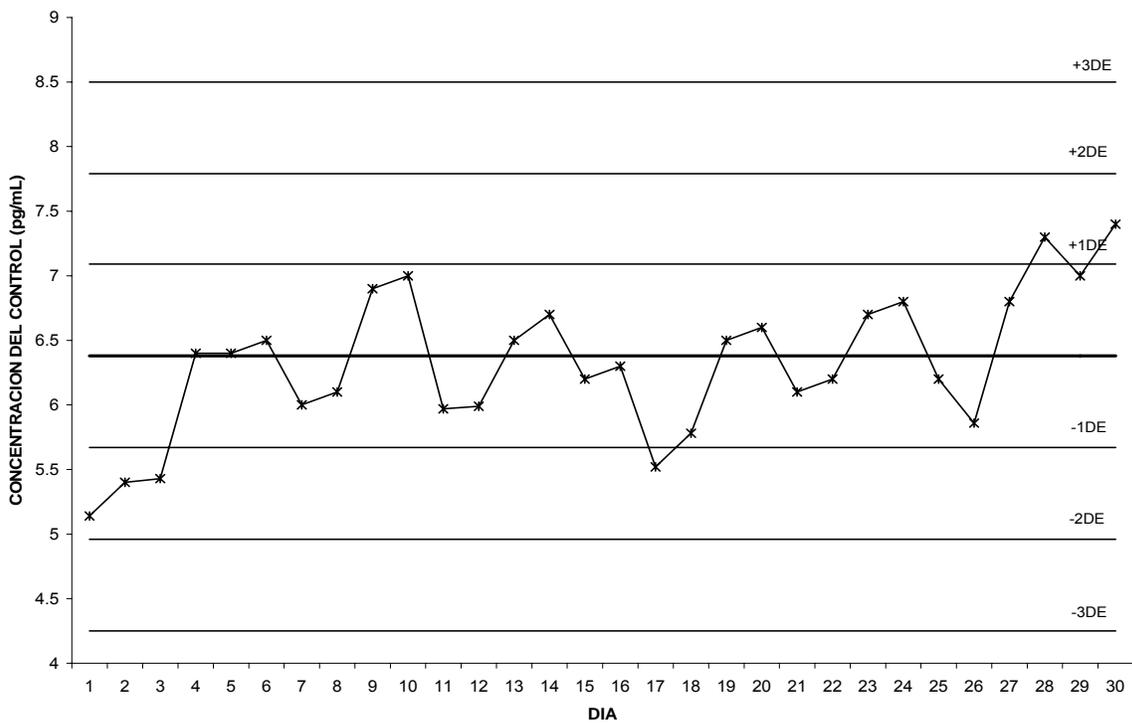


Gráfico 11 Curva de Levey Jennings del control normal de IL-10



Arturo Morales Morales
Autor

Lic. Guillermo Reyes Del Cid
Asesor

Licda. Alba Marina Valdés
Revisora

Licda. Vivian Matta
Directora

Oscar Cobar Pinto, Ph.D.
Decano