

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



Rol de la actividad de mTORC y polarización pro-aterogénica
de monocitos en la elevación del riesgo cardiovascular en
pacientes con AR

Claudio A. Karsulovic Cvitanich

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS

Director de Tesis: Dra. Annelise Goecke
Dra. Julia Guerrero

2019

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas presentada por el candidato

Claudio Karsulovic Cvitanich

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Médicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de septiembre de 2019

Dra. Annelise Goecke S.
Directora Clínica de Tesis
Jefa Sección de Reumatología, Hospital
Clínico Universidad de Chile

Dra. Julia Guerrero P.
Directora Básica de Tesis
Jefa Laboratorio de
Inmunomodulación Neuroendocrina -
ICBM

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Maria E. Santolaya
Presidente Comisión de examen

Prof. Dr. Miguel O`Ryan

Prof. Dr. Luis Sobrevia

Dedicatoria

Dedicado a la más maravillosa compañera de vida que se pueda tener: Mi amada y admirada esposa. ¡¡Tu apoyo, cariño y ayuda en esta tesis son los cimientos donde comienzo a construir el resto de mi carrera... Gracias!!

Agradecimientos

Quiero primero agradecer a Lía Hojman, mi esposa, quien fue la inspiración y apoyo que requerí desde el día uno para comenzar y luego completar esta investigación. Sus constantes revisiones y correcciones fueron fundamentales para poder sortear las dificultades que significa el trabajo y la formación simultánea en el área clínica y científica.

Al Prof. Jose Tomas Karsulovic Carrasco (QEPD), mi padre, brillante académico e investigador, quien me inspiró con su carrera y con su amor irrestricto por la Universidad de Chile y sus alumnos, a desarrollarme en el area académica y como persona.

A mis tutoras, Dra. Annelise Goecke y Dra. Julia Guerrero, quienes confiaron desde el primer día en mis a veces poco ortodoxas ideas, me enseñaron pacientemente y formaron como investigador en estos largos 8 años. Lo aprendido en este tiempo lo debo a la paciente y cariñosa guía de mis queridísimas tutoras.

Al Prof. Dr. Manuel Kukuljan quien me mostró temprano en mi formación de medico la belleza de la investigación científica en el área medica y quien luego me recibió con su apoyo en los primero años del doctorado.

A Fabian Tempio y Claudio Perez, del Laboratorio de Regulación e Inmunología de Cáncer, quienes se convirtieron en queridísimos colegas. Su ayuda fue fundamental en el desarrollo de los experimentos, participando en todas las fases del proceso apoyándome en lo técnico con el 100% de esta tesis, sin ellos, no hubiese sido posible completarla.

A la Dra. Mercedes Lopez, quien tuvo la inmensa amabilidad de participar como una “Tercera Tutora” en esta tesis. Su ayuda, consejo y tiempo donado en mi formación fueron fundamentales para lograr el objetivo.

A Pilar Carrasco y su equipo, Danitza y Paskale de la Clinica Reumatologica Avanzada (CREA), quienes fueron imprescindibles en la fase mas critica del reclutamiento y toma de muestra de los pacientes participantes en este estudio. Su entrega y cariñosa ayuda fueron fundamentales para completar las ultimas etapas de esta tesis.

A Nice Zampoña, enfermera de Clínica Alemana, quien participó y ayudó en su tiempo libre en el reclutamiento de pacientes. Su amable y desinteresada ayuda me permitieron completar las difíciles etapas iniciales del reclutamiento de pacientes.

A Faustino Alonso, fundamental en la construcción de estadística de mi trabajo, quien me entregó, incondicionalmente, apoyo y ayuda en el desarrollo del proyecto.

A mi familia, mi madre, Maria A. Cvitanich por formarme desde niño como un profesional íntegro. Su apoyo en mi etapa universitaria y de postgrado fue siempre incondicional y fundamental para todos mis logros. Mis hermanos, Jorge y Tomas por acompañarme en todo el proceso con paciencia y cariño y compartiéndome a mis queridísimos sobrinos José Ignacio, Miriana, Rosario y Antonia quienes me dan felicidad siempre que los veo.

Especialmente Tomas, ha sido mi gran amigo y compañero de proyectos. Sin su apoyo y paternal ayuda no hubiese sido posible congeniar todo lo necesario para completar esta tesis.

A Sergio y Patricia, mis suegros, por su apoyo, cariño y ayuda en todo el proceso. Se convirtieron en segundos padres con su constante preocupación en todos los aspectos de mi formación.

Agradezco a CONICYT y su Beca de Capital Humano Avanzado quienes financiaron mi formación de doctorado. Además a la Oficina de Apoyo a la Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, quienes financiaron partes de mi investigación.

A Cecilia Carter por su trabajo insesante en terminar administrativamente esta tesis. Largas horas de trabajo que con mucho cariño puso en ayudarme a completarla y que le agradezco profundamente.

Finalmente, a mi queridísima Universidad de Chile, quien me recibió y formó todos estos años. Aquí me siento en casa y más cerca de mi padre.



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES



ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

FECHA: 21 de Diciembre de 2016.

PROYECTO: "ROL DE LA ACTIVIDAD DE MTORC Y POLARIZACIÓN PRO-ATEROGÉNICA DE MONOCITOS/MACRÓFAGOS EN LA ELEVACIÓN DEL RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON AR"

INVESTIGADOR RESPONSABLE: DR. CLAUDIO KARSULOVIC

INSTITUCIÓN: DEPARTAMENTO FISIOLÓGÍA Y BIOFÍSICA FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.

Con fecha 21 de Diciembre de 2016, el proyecto ha sido analizado a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de la Guía Internacional de Ética para la Investigación Biomédica que involucra sujetos humanos CIOMS 1992, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de la información proporcionada en el texto del proyecto el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión original de fecha 29 de Noviembre de 2016.

Se extiende este documento por el periodo de un año a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

LUGAR DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO:

- SERVICIO DE REUMATOLOGÍA, HOSPITAL CLÍNICO DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES



21 DIC. 2016

**INTEGRANTES DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
EN SERES HUMANOS**

NOMBRE	CARGO	RELACIÓN CON LA INSTITUCIÓN
Dr. Manuel Oyarzún	Presidente	Sí
Dr. Hugo Amigo	Miembro	Sí
Dra. Lucía Cifuentes	Miembro	Sí
Dra. Grisel Orellana	Miembro	Sí
Sra. Gina Raineri	Miembro	Sí
Dra. María Ángela Delucchi	Miembro	Sí
Dr. Miguel O’Ryan	Miembro	Sí
Sra. Claudia Marshall	Miembro	Sí
Dra. Julieta Gonzalez	Miembro	Sí

Santiago, 21 de Diciembre de 2016.


Prof. Gina Raineri B.
Secretaria Ejecutiva CEISH

c.c.: - Proyecto Nº 191-2016
- Archivo Acta nº 127

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl

Índice	Página
2. Resumen	
a. Resumen del Proyecto de Tesis	12
3. Introducción	14
4. Hipótesis y Objetivo	22
5. Resultados	23
6. Discusión	41
7. Limitaciones del estudio	44
8. Referencias	45
9. Materiales y Métodos	51

Abreviaturas

AR: Artritis Reumatoide
LES: Lupus eritematoso sistémico
EA: Espondilitis Anquilosante
APs: Artritis Psoriática
M1: Monocito Fenotipo 1 (inflamatorio)
M2: Monocito Fenotipo 2 (no inflamatorio)
VHS: Velocidad de sedimentación
PCR: Proteína C Reactiva
ECV: Enfermedad Cardiovascular
SCORE: Systematic Coronary Risk Evaluation
AHA: American Heart Association
S6R: S6 Ribosomal Protein
S6Rp: Phosphorylated S6 Ribosomal Protein
CD14: Clúster de Diferenciación 14
CD16: Clúster de diferenciación 16
CD163: Clúster de diferenciación 163
HLA-DR: Human Leukocyte Antigen – DR isotype
CCR2: C-C chemokine receptor type 2
LC3b: Microtubule Light Chain 3b
mTORC: Mammalian target of rapamycin
tSNE: t-distributed stochastic neighbor embedding
IFN- γ : Interferón gamma
IL12: Interleuquina 12
IL-1b: Interleuquina 1 beta
IL-6: Interleuquina 6
IL-4: Interleuquina 4
IL-10: Interleuquina 10
CD19: Clúster de Diferenciación 19
CD66b: Clúster de Diferenciación 66b
CD3: Clúster de Diferenciación 3
IMTc: Grosor de la íntima media carotídea
VPP: Valor predictivo positivo
PBMC: Mononucleares de sangre periférica
FR: Factor reumatoideo
AntiCCP: Anticuerpos antipéptido citrulinado
DMARDS: Drogas modificadoras de enfermedad
DAS28: Disease activity score de 28 articulaciones
HDL: High Density Lipoprotein

2. Resumen

Introducción: La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad crónica sistémica caracterizada por compromiso destructivo articular y una de las enfermedades autoinmunes más prevalentes. La enfermedad cardiovascular es la causa más frecuente de mortalidad en la población general. El riesgo cardiovascular en pacientes con AR no puede ser adecuadamente medido con *scores* habituales. Ajustes que incluyen la inflamación clínica no han podido corregir el exceso de riesgo reportado en series clínicas. La seropositividad para factor reumatoideo (FR) y antipéptido citrulinado (antiCCP) han demostrado relacionarse con mayor desarrollo de ateromatosis. El fenotipo macrofágico y la apoptosis son eventos fisiopatológicos importantes en la patogenia de la aterogénesis. El fenotipo de macrófagos residentes en el tejido vascular se ha demostrado alterado hacia un perfil preferentemente M1 en pacientes con eventos cardiovasculares. Los monocitos circulantes son las células precursoras de los macrófagos residentes en la placa y también presentan perfiles o fenotipos desde antes de su diferenciación. Se ha relacionado un perfil tipo M1 de monocitos circulantes con patología inflamatoria crónica y metabólica incluyendo la AR y la ateromatosis. mTORC, complejo quinasa regulatoria, ha demostrado tener un rol en la determinación del fenotipo macrofágico y de monocitos en diferenciación. Por otro lado, la autofagia, proceso catabólico intracelular, participa en la fenotipificación de éstos y puede a su vez ser modulado por mTORC. No se sabe si mTORC y autofagia son relevantes en el estatus inflamatorio sistémico y en el desarrollo de aterogénesis en AR.

Hipótesis: Pacientes con AR y eventos cardiovasculares previos, tienen mayor actividad de mTORC en monocitos circulantes con disminución de la actividad autofágica en plasma y aumento de la relación M1/M2 de monocitos de sangre periférica.

Materiales y métodos: Se reclutó 9 pacientes asistentes a Policlínico de Reumatología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile con edad entre 18 y 65 años diagnóstico de AR según guías EULAR/ACR 2010 y antecedentes de eventos cardiovasculares previos (ECV). Se parearon con pacientes diagnosticados de AR sin eventos cardiovasculares previos, para factores de riesgo cardiovascular clásicos y otros específicos de la AR como: sexo, edad, duración de AR, comorbilidades y número de drogas antireumáticas modificadores de enfermedad (DMARDS). Adicionalmente se tomó muestra de sangre a 6 sujetos sanos para realizar el mismo análisis. Se tomó muestra de sangre periférica para determinación de HDL, niveles de proteína C reactiva (PCR) y velocidad de sedimentación (VHS) para cálculo de

DAS28. En la misma muestra de sangre se evaluaron actividad de mTORC, autofagia y extracción de PBMC y fenotipificación de monocitos para asociación con la presencia o ausencia de eventos cardiovasculares previos.

Resultados: Respecto de sujetos sanos y de pacientes con AR sin ECV, los pacientes con AR con ECV presentan aumento de la frecuencia M1 de monocitos circulantes y los niveles intracelulares de interleuquinas proinflamatorias. La actividad de mTORC, medida por S6R fosforilado se elevó de igual manera en pacientes con AR con ECV. Autofagia plasmática demostró estar elevada en pacientes con AR y ECV y correlacionó con los niveles de citoquinas inflamatorias intramonocitarias.

3. Introducción

Artritis Reumatoide y riesgo cardiovascular

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica sistémica caracterizada por inflamación sinovial, formación de pannus, erosiones de cartílago articular y hueso marginal con destrucción de la articulación (1). Su evolución es lenta y progresiva con periodos de exacerbación y remisión. Es una de las enfermedades autoinmunes con mayor prevalencia a nivel mundial (2). Su prevalencia varía entre 0,5 y 1% de la población general según las series (3). Afecta principalmente a mujeres entre los 45 y 65 años (4). La enfermedad activa se asocia a destrucción rápida de la articulación redundando en deterioro marcado de la funcionalidad y la calidad de vida, generando un ausentismo laboral hasta 5 veces mayor que el de la población sin AR (5). Además de la disminución en la funcionalidad, los pacientes con AR tienen un aumento neto en la mortalidad, la que alcanza un riesgo relativo de 1,13 respecto a población sin AR y aproximadamente 8 años menos de expectativa de vida respecto al mismo grupo (6). La enfermedad cardiovascular, que agrupa al infarto al miocardio, accidente cerebrovascular y enfermedad arterial periférica, es la primera causa de mortalidad en pacientes con AR, dando cuenta del 30 al 50% de las muertes prematuras (7). Esta comorbilidad se presenta además a edades más tempranas (8). La tasa de mortalidad estandarizada por enfermedad cardiovascular en pacientes con AR es de 1,6 a 1,8 según las series (9-11), reportándose un riesgo acumulado similar al de otras patologías conocidamente relacionadas con la enfermedad cardiovascular como diabetes mellitus 2 y enfermedad renal crónica (12-14). Van Halm en el 2009, describió en pacientes con AR en manejo tratamiento ambulatorio, una prevalencia de enfermedad cardiovascular del 12,9% versus un 12,4% en pacientes diabéticos de otra cohorte de características similares. Aún más, el *odds ratio* (OR) luego de ajuste por factores de riesgo cardiovascular clásicos fue 2,7 versus 2,0 (12). El engrosamiento ultrasonográfico de la íntima carotídea (IMTc) es un predictor de riesgo cardiovascular conocido pero poco difundido por su costo (15). Un IMT sobre el percentil 75 (o mayor a 0.9 mm (16)) se relaciona con muy alto riesgo cardiovascular (15, 17, 18). En la cohorte chilena del estudio multicéntrico CARMELA (Cardiovascular Risk Factor Multiple Evaluation in Latin America), se relacionó significativamente el nivel de IMTc con factores de riesgo conocidos de enfermedad cardiovascular. En este mismo estudio, se demostró que en población chilena sana de 25 a 45 años el cuarto cuartil de IMTc (percentil 75) está sobre 0.67mm. Este grupo de individuos tiene significativamente más factores de riesgo que el primer cuartil (19). Se demostró además que en el grupo de pacientes con mayor índice de masa

corporal e hipertensión arterial, el IMTc estaba significativamente aumentado (20, 21). La sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo (VPP) del IMTc para diagnóstico de aterosclerosis, demostradas por tomografía, en pacientes sin eventos cardiovasculares en consulta cardiológica fue de 77%, 78% y 85%, respectivamente. El valor de corte para demostrar la existencia de placas fue de 0.82mm (22). El valor de corte y su sensibilidad, especificidad y VPP en otras patologías varían notoriamente. En EPOC por ejemplo el punto de corte para presencia de placas de ateroma es de 1.25mm y la sensibilidad, especificidad y VPP son 91%, 89,7% y 86,7% (23).

Ristic en el 2010 realizó medición del IMT de mujeres con AR sin factores de riesgo clásico para enfermedad cardiovascular y los comparó con mujeres sin AR con similares condiciones generales basales. Demostró que el grosor de la íntima-media de estas pacientes fue significativamente mayor que el grupo control. Además, en el análisis multivariado se observó que el diagnóstico de AR es un factor independiente de riesgo para engrosamiento de la íntima-media carotídea (24). Ikdahl en el 2016 describió el valor predictivo del IMTc en pacientes con AR. En pacientes con edad promedio de 59 años y 17 años de enfermedad, el IMTc fue capaz de predecir la ocurrencia de eventos cardiovasculares aún ajustado por factores de riesgo clásico y variables relacionadas con la AR. Además un valor mayor que 0,9mm se relacionó con menor supervivencia por eventos cardiovasculares (25).

Los factores de riesgo clásicos de enfermedad cardiovascular en población general son: edad mayor de 55 años en hombres y 65 años en mujeres, presión arterial elevada, tabaquismo, colesterol elevado, diabetes mellitus, sedentarismo, obesidad e historia familiar de enfermedad cardiovascular (26).

En la AR los factores de riesgo clásicos de enfermedad cardiovascular descritos, son más frecuentes y se manifiestan desde etapas tempranas (27). Se ha reportado a la hipertensión arterial, la hiperglicemia y el tabaquismo como los más prevalentes (28), alcanzando este último un Hazard Ratio (HR) para mortalidad global de 1,98 (1,56-2,53) sobre los no fumadores (29).

Se han diseñado numerosos *scores* para predecir el riesgo cardiovascular en población general. El más difundido es el Framingham Risk Score (FRS), *score* de predicción de eventos cardiovasculares en período de 10 años (30). En el 2013, la Asociación Americana de Cardiología (AHA) revisó la evaluación de riesgo cardiovascular, vigente hasta ese momento, en población general. En esta guía, la AHA menciona que, para predecir de mejor manera el riesgo cardiovascular, las variables que estadísticamente merecen ser incorporadas en el cálculo son: Edad, presión arterial sistólica, colesterol HDL, diabetes y tabaquismo (31). El

nuevo *score* a 10 años, propuesto por la AHA, que predice adecuadamente el riesgo en gran parte de la población general, sin embargo cuando éste y otros *scores* como el Reynolds Risk Score (RRS) son aplicados a pacientes con AR los resultados subestiman el riesgo cardiovascular y no se ajustan a la mortalidad vista en la práctica clínica (32). Más aún, algunos autores proponen la necesidad de multiplicar el valor resultante del cálculo por 1,5 o aumentar 10 años a la edad del paciente para lograr un valor corregido (33). Es entonces evidente que existe un exceso de mortalidad cardiovascular en pacientes con AR que los factores de riesgo clásico no son capaces de explicar. Se ha propuesto que la actividad de la enfermedad y la inflamación crónica asociada, podrían explicar este exceso de mortalidad (34).

La inflamación es parte importante de la etiopatogenia de la aterogénesis y la enfermedad cardiovascular. Luego del daño inicial del endotelio por hipertensión arterial, *shear stress* o tabaco, se expresan moléculas de adhesión y se inicia una cascada inflamatoria con una fase de infiltración por células de fase aguda y expresión de citoquinas y quimioquinas que llevan a la remodelación endotelial y neointimal (35). En patologías caracterizadas por inflamación crónica como las de origen autoinmune, el riesgo cardiovascular ha demostrado ser mayor y no explicado por un aumento de los factores de riesgo cardiovascular clásicos. Este es el caso del Lupus Eritematoso Sistémico (LES), donde el riesgo cardiovascular es mayor que el de la población general ajustado por factores de riesgo y su tratamiento y control clínico se traducen en una disminución de éste (36, 37).

En el tratamiento clínico de la AR, el *outcome* más relevante es el control de la enfermedad, el que se define por disminución de la inflamación y la mejoría clínica (38). En AR, una de las mediciones más usadas para definir una enfermedad controlada, es el Score de Actividad de Enfermedad con 28 articulaciones (DAS28), que incluye el número de articulaciones dolorosas e inflamadas y el nivel de PCR o VHS. El DAS28 es la manera en que en clínica se mide la magnitud del proceso inflamatorio. Un valor de DAS28 menor a 2,6 se considera remisión de la enfermedad (38). Considerando esto, Arts en el 2015 demostró que el grado de actividad de la enfermedad, medido por DAS28, se asocia con la magnitud del riesgo cardiovascular. En pacientes con AR sin factores de riesgo clásicos, se observó que a mayor valor de DAS28 (mayor actividad de la enfermedad), la supervivencia a 10 años por eventos cardiovasculares, disminuye (39).

Considerando entonces a la inflamación como el posible elemento que explica el exceso de riesgo cardiovascular en pacientes con AR; Solomon en el 2015, diseñó un nuevo *score* de riesgo incluyendo aspectos específicos de pacientes con AR como duración de la enfermedad, control de la enfermedad, uso de corticoides y pérdida de funcionalidad. Usando una cohorte

de 40.000 eventos cardiovasculares en pacientes con AR, formuló el Expanded Risk Score – Rheumatoid Arthritis (ERS-RA) (40). Sin embargo, este *score* y otros como versiones adaptadas del Systematic Coronary Risk Evaluation (SCORE) que incluyen actividad de la enfermedad y otros parámetros clínicos que traducen inflamación crónica, no han podido corregir completamente el exceso de mortalidad que existe en pacientes con AR y su aplicación no se ajusta adecuadamente a la mortalidad observada en clínica (41). Esto sugiere la presencia de uno o más factores aún no incluidos en estos *scores* que podrían predecir de mejor manera la mortalidad cardiovascular en pacientes con AR. La incapacidad de la inflamación de predecir adecuadamente eventos cardiovasculares en pacientes con AR se demuestra además al comparar éstos con pacientes con artritis inflamatorias no-AR. La AR tiene una mayor mortalidad cardiovascular a pesar de compartir la inflamación sistémica con las artritis no-AR. Castañeda en el 2015 describió la prevalencia de enfermedad cardiovascular en una cohorte prospectiva de pacientes con AR seguidos por 10 años desde su primera consulta. En AR, Espondilitis Anquilosante (EA), Artritis Psoriática (APs) y un grupo ajustado por edad, sexo y comorbilidades, la prevalencia fue de 10,4% en pacientes con AR versus 7,6%, 7,4% y 6,2% en pacientes con EA, APs y el grupo control respectivamente (8). Esto evidencia que los eventos cardiovasculares en AR no son posibles de predecir de manera precisa incorporando factores de riesgo clásicos ni considerando la inflamación clínica, al menos como la estimamos actualmente, en las ecuaciones de cálculo. Se demuestra entonces la necesidad de plantear nuevos factores, hasta el momento no considerados, que den la posibilidad al clínico de diseñar estrategias de prevención o tratamientos específicos, precoces y eficaces en pacientes con AR con alto riesgo cardiovascular.

Monocitos en la ateromatosis y AR

Numerosos tipos celulares han sido relacionados con los procesos inflamatorios crónicos de bajo grado involucrados en las alteraciones metabólicas y la formación de la placa de ateroma. Los monocitos circulantes, células originadas en la médula ósea, tienen un rol particularmente relevante en la generación y progresión de la placa de ateroma (42). Los monocitos migran a diferentes tejidos convirtiéndose en macrófagos residentes, célula que adquiere capacidad fagocítica y moduladora del ambiente inflamatorio (43). En AR, las células de la línea mielomonocítica, de donde provienen monocitos, como son los osteoclastos; participan en las alteraciones articular que definen la enfermedad. Estas células activadas en articulaciones de pacientes con AR y en modelos animales de la misma enfermedad participan activamente de las erosiones y destrucción de estas que resultan en disfunción y deformidad.

En la placa de ateroma, los monocitos forman macrófagos, células con diferenciación terminal que participan de la inmunidad innata y adquirida modulando los cambios inflamatorios que llevan a la expansión y fractura de la placa. Los macrófagos pueden presentar distintas características fenotípicas dependiendo de las proteínas de membrana expresadas y las citoquinas producidas (44). Así se han descrito 3 fenotipos principales: M1 o proinflamatorio, caracterizado por la expresión predominante de CD86 y producción de citoquinas como IFN- γ e IL12; M2 o antiinflamatorio, con mayor expresión de CD163 y productor de citoquinas como IL4; y M reguladores productores principalmente de IL10 (45).

Estos macrófagos residentes en las placa de ateroma y sus fenotipos específicos se han relacionado directamente con la formación y desarrollo de la placa de ateroma mediante acumulación de colesterol y destrucción de la matriz extracelular (46). Modelos con animales *knock out* para proteínas que aceleran la ateromatosis, han demostrado reclutar mayor cantidad de monocitos a la placa(47). Estas y otras observaciones, llevaron a estudiar el fenotipo macrofágico en la placa, describiendo una predominancia M1 en las placas que se accidentan(48).

En circulación, antes de llegar al tejido, los macrófagos y osteoclastos se denominan monocitos. Estos se clasifican dependiendo de la expresión de proteínas de membrana CD14 y CD16 (49). En 2010, un consorcio internacional con auspicio de IUIS (Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), propuso una clasificación de *subsets* de monocitos en base a la expresión de membrana de CD14 y CD16 (50). Los separó en 3 subgrupos principales: monocitos clásicos, CD14++CD16- correspondientes al 80% a 90% de monocitos circulantes; monocitos intermedios CD14+CD16+ siendo aproximadamente el 5% del total y monocitos no-clásicos, CD14+CD16++ (50, 51). En los últimos años, se han estudiado las características funcionales de estos 3 *subsets*. Se han observado comportamientos diferentes en relación a su capacidad fagocítica y compromiso inflamatorio (52): los monocitos CD14++CD16- (clásicos) corresponden a aquellos con capacidad fagocítica plena y producción de citoquinas clásicamente relacionadas con perfil antiinflamatorio en otros tipos celulares como IL-3 e IL-4 (53); el *subset* no-clásico ó CD14+CD16++ es definido como inflamatorio y ha sido caracterizado por la producción de citoquinas como IL-1 β e IFN γ (52). La población intermedia, considerada de transición, con expresión de citoquinas en valores intermedios, ha sido caracterizada en múltiples patologías y actualmente se encuentra en activo estudio en patologías metabólicas y autoinmunes como AR, lupus, diabetes mellitus y obesidad (52, 54-56).

El perfil de monocitos circulantes se ha asociado a diferentes etapas del proceso de ateromatosis. Se ha descrito contracción del *subset* clásico de monocitos en ateromatosis demostrada en ecografías carotideas(57). Además, en pacientes con reestenosis del stent post-IAM, el *subset* intermedio se encuentra expandido, sugiriendo participación diferencial de las distintas subpoblaciones circulantes en diferentes etapas de la enfermedad(58). Incorporando análisis multiparamétrico con tSNE, se demostró que las subpoblaciones intermedia y no-clásica se encuentran expandidas proporcionalmente al *Score* de Gensini, valor angiográfico que permite cuantificar la ateromatosis(59). Sin embargo lo anterior, hasta ahora, la asociación entre los diferentes perfiles de monocitos circulantes y la AR ha sido sólo esbozada (51). Revisiones recientes posicionan a los monocitos con expresión de marcadores proinflamatorios como los más relevantes en la formación y progresión del daño articular en AR(59), sin embargo, no se ha demostrado el comportamiento de cada *subset* en la ateromatosis acelerada de pacientes con AR(49).

Dada la dificultad en establecer perfiles confiables y predictores de actividad en monocitos circulantes en enfermedades cardiovasculares y autoinmunes, se han descritos distintas subclasificaciones en relación a marcadores de superficie de perfil pro o antiinflamatorio de manera análoga a lo descrito en macrófagos(52, 60). Siguiendo esta idea, se han expuesto diferentes marcadores que determinan comportamientos diferenciales en relación con la producción de citoquinas y la actividad fagocítica(52). CD86, CD68 y CCR2 se asocian a perfiles inflamatorios de monocitos (también llamados M1)(59), mientras que CD163, y la ausencia de CCR2 a perfiles M2 o no-inflamatorios(61). Estos perfiles también han demostrado comportamientos diferentes según la patología estudiada: En pacientes con ACV isquémico, los monocitos circulantes mostraron niveles aumentados de CD86 y disminuidos de CD163 resultando en una relación M1/M2 aumentada(62). De forma concordante con lo anterior, en otro estudio la subpoblación CD14⁺⁺CD16⁻CCR2⁺ demostró correlación significativa con grosor la íntima carotidea(63). En Nefropatía membranosa, patología con predominio de remodelación epitelial, se demostró expandida la población CD14⁺CD163⁺ (M2) correlacionándose además con el nivel de proteinuria(64). Entonces, podría hipotetizarse que en situaciones clínicas donde predomina la inflamación aguda hay una participación del *subset* de monocitos M1 mientras que en condiciones proliferativas endovasculares pauciinflamatorias y de evolución crónica, tiene un rol especial el *subset* M2.

Particularmente en AR, la relación M1/M2 de monocitos circulantes, medido como la razón entre CD14+CD68+CCR2+ y CD14+CD163+CCR2- + se correlacionó positivamente con la actividad de osteoclastos (célula participante de la destrucción articular)(61). Además, monocitos definidos como M1 en cultivo, respondieron a la estimulación con LPS con niveles aumentados de IL-6 a diferencia de los definidos como M2(61). Estos datos en conjunto permiten plantear que el análisis de las subpoblaciones circulantes de monocitos en pacientes con AR y ECV debe ser realizado utilizando múltiples clasificaciones simultáneamente(65).

mTORC en fenotipo monocitos y riesgo cardiovascular

El complejo proteico mammalian target of rapamycin (mTORC) es una quinasa que participa de la regulación de diferentes procesos celulares como proliferación celular, apoptosis, sobrevivencia y crecimiento celular (66). Es parte de 2 complejos funcionalmente diferentes: mTORC Complex 1 y mTORC Complex 2 que activan diferentes vías (67). Ambas vías interactúan en distintos puntos activando e inhibiendo diferentes funciones celulares (66). Ante la activación, el complejo 1 fosforila específicamente a la proteína ribosomal S6 (S6RP) y el complejo 2 a AKT de manera aminoácido específica en serina 473 (68). Dado que los monocitos modificarían su fenotipo en condiciones patológicas determinadas, este complejo de adaptación celular debería ser importante en la determinación de estos fenotipos.

La actividad de mTORC demostró ser relevante en la generación y desarrollo de la placa de ateroma (69). Uno de los primeros estudios que demostraron la importancia de mTORC en esta patología fue el de Gallo en 1999, quien realizó angioplastias a cerdos con y sin administración de Rapamicina. El grupo con el fármaco tuvo una área luminal coronaria un 50% mayor al grupo control (70), concluyendo que la inhibición de mTORC a nivel local disminuye la reestenosis y por lo tanto el reinfarto. Desde hace varios años, compuestos comerciales como everolimus, inhibidor de mTORC, se han usado para prevenir los cambios endoteliales en pacientes que reciben angioplastia con *stent* (71). Actualmente el uso de *stents* impregnados con everolimus es de amplio uso en la terapia con angioplastia de pacientes con cardiopatía coronaria evitando así la re-estenosis del *stent* (72). Serruys publicó en el 2005 el primer estudio randomizado comparando el manejo de lesiones coronarias con *stents* metálicos (BMS) versus *stents* impregnados con everolimus (DES). Demostró tanto que a los 6 meses como en el seguimiento a largo plazo, un área luminal un 60% mayor en el grupo con DES y ninguna re-estenosis a los 5 años de seguimiento (73, 74). Verheye en el 2007, demostró en ratones con dieta rica en colesterol y placas tratadas con DES y BMS, que los primeros tenían significativamente menor infiltración de macrófagos en la íntima. En los

explantes, se demostró que los macrófagos tenían mayor apoptosis y vacuolización del citoplasma(75). Estos elementos demuestran la importancia de mTORC en el desarrollo de la placa de ateroma y permiten plantear un posible mecanismo de acción a través de la modulación de la sobrevivencia y funciones intracelulares de los macrófagos de la placa(69).

En una publicación editorial Tian en 2014, planteó la posibilidad que mTORC tenga un rol en el desarrollo y progresión de la placa de ateroma mediante polarización macrofágica a un fenotipo M1 (48) y disminución de la capacidad de adaptación al daño de células endoteliales con consecuente apoptosis (76). En su respuesta a la carta inicial de Tian, Guo en el 2015 describió evidencia creciente de que mTORC cumple un rol en la polarización macrofágica y la estabilidad de la placa de ateroma en pacientes con factores de riesgo cardiovascular clásicos (76). Chen estudió en el 2012 el rol de mTORC en la polarización de monocitos humanos de sangre periférica ante la estimulación con LPS. Cuando los monocitos se incubaron previamente con rapamicina, se modificó el fenotipo macrofágico resultante frente a esta estimulación. Con esto demostró la expresión diferencial de interleuquinas por parte de los monocito/macrófagos estimulados con LPS ante la inhibición de mTORC con rapamicina (77). La activación de mTORC se asocia entonces a placas más inflamatorias con mayor expresión de marcadores M1 en los macrófagos(48, 77).

Con estos antecedentes mTORC podría entonces estar involucrado en el proceso de ateromatosis al menos mediante la modulación del fenotipo monocitario/macrofágico. Sin embargo no se conoce cómo mTORC podría mediar estos cambios funcionales (48).

Autofagia en fenotipo de monocitos y modulación de mTORC

La autofagia es un proceso celular catabólico esencial en la mantención de la homeostasis celular y tisular (78, 79). Su rol principal es la degradación de material proteico y organelos en desuso disminuyendo el stress intracelular (78). Es uno de los mecanismos más conservados de adaptación celular a las noxas externas como las que sufren las células endoteliales que componen la placa de ateroma (80). La autofagia ha demostrado estar relacionada tanto con la activación y desactivación de mTORC como con la polarización de monocitos (81). Ante la inhibición de la autofagia *in vitro*, macrófagos en cultivo expresan marcadores M1(82). Asimismo, se ha demostrado que macrófagos con perfil M2, tienen mayor activación del flujo autofágico (75).

Chang en 2013 propuso que la inhibición de la autofagia en macrófagos en cultivo polarizados a M2 (mediante inducción por medio de cultivo de hepatoma, activador toll-like receptor 2), induce producción de citoquinas del perfil M1, principalmente IL-12 (83). Chang demostró

además que macrófagos polarizados in vitro a M2, expresan mayores niveles de proteína cadena liviana 3B (LC3B), un marcador de autofagia (82). En el estudio de Verheye de 2007, se observó la vacuolización de macrófagos y aumento de LC3B, eventos de la activación del flujo autofágico. Esto permitió relacionar el aumento del flujo autofágico con la inhibición de mTORC y la disminución en la migración de monocitos a la placa (69).

Este y otros hallazgos se han extrapolado frecuentemente a monocitos desde experiencia en ratones o macrófagos humanos(60), sin embargo, no existe evidencia disponible de como los monocitos modifican su perfil circulante en diferentes situaciones clínicas y si mTORC y/o Autofagia participan de ello.

4. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Pacientes con AR y eventos cardiovasculares previos tienen mayor actividad de mTORC en monocitos circulantes asociado a disminución de la actividad autofágica en plasma y aumento de la relación M1/M2 de monocitos en sangre periférica respecto a pacientes AR sin ECV previos.

Objetivo General

Determinar la actividad de mTORC y la relación M1/M2 de monocitos circulantes y actividad autofágica en plasma en pacientes con AR con ateromatosis y eventos cardiovasculares previos.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar la población en estudio desde el punto de vista demográfico, clínico, serológico y determinar índices de actividad de AR y riesgo cardiovascular determinado por registro de eventos cardiovasculares previos.
2. Determinar la actividad de mTORC en monocitos circulantes de pacientes con AR con y sin eventos cardiovasculares previos.

3. Determinar el flujo autofágico en sangre periférica de pacientes con AR con y sin eventos cardiovasculares previos.
4. Determinar la relación M1/M2 en monocitos circulantes de pacientes con AR con y sin eventos cardiovasculares previos.

5. Resultados

Descripción de las poblaciones con AR con y sin eventos cardiovasculares previos; y grupo de sujetos sanos.

Como podemos observar en la **Tabla I**, la proporción de hombres es algo mayor a la de la población habitual con diagnóstico de AR. Esto probablemente se debe a la mayor prevalencia de eventos cardiovasculares en población masculina. El promedio de edad es de 63 y 62 años en grupos con evento y sin evento, respectivamente. Esto también se debe al mayor riesgo cardiovascular derivado de la edad y el tiempo necesario para aparición del ECV. La población sana se seleccionó con paridad de género y de edad temprana como control del “mínimo” riesgo cardiovascular.

8 de los 9 pacientes con ECV seleccionados tienen diagnóstico de IAM, la prevalencia inicial de esta patología en nuestra institución es mayor, por lo que luego del reclutamiento resultó sobrerrepresentada. La mayoría de los pacientes con AR y ECV tienen factores de riesgo adicionales como hipertensión y dislipidemia. Este aspecto era esperable ya que la enfermedad es en esencia multifactorial y la edad de los pacientes es también elevada. El grupo con AR sin ECV, compartieron por pareamiento estas características.

El tabaquismo fue frecuente en el grupo reclutado. El índice paquetes año fue mayor, aunque no significativamente en el grupo con ECV. Dado el n pequeño, la presencia de 2 pacientes con tabaquismo severo en este grupo, elevaron los valores resultando el promedio más elevado.

Si bien no fue un criterio de pareamiento, el uso crónico de Atorvastatina fue evaluado entre los grupos. Los pacientes con ECV previo, por norma AHA (*American Heart Association* por sus siglas en inglés), deben usar estatinas como “protector” de reinfarto, por lo que todos los pacientes la usaban. En el grupo sin ECV, 7 de los 9 la usaban por prescripción previa. Dado que la atorvastatina ha demostrado modificar aspectos fisiopatológicos la placa de ateroma, es importante mencionar la similitud de ambos grupos.

En términos de los factores propios de la AR, la mayoría de los pacientes tiene en torno a 10 años de AR, tiempo habitualmente relacionado con incremento del riesgo de complicaciones. Ocho pacientes son usuarios habituales de corticoides y solo dos están en tratamiento con drogas biológicas dado muy probablemente por dificultad en el acceso a estos fármacos. Los valores de DAS28 para medición de la actividad de la enfermedad fueron altos muy probablemente asociado a que se consiguió reclutar pacientes en activa visita a HCUCH.

TABLA I. Características clínicas de los pacientes y controles incluidos en el estudio

<i>Variables</i>	<u>Grupo 1</u> AR con ECV (N = 9)	<u>Grupo 2</u> AR sin ECV (N = 9)	<u>Grupo 3</u> Sujetos sanos (N = 6)	
Características pacientes				
Edad, años \pm DS	62 \pm 3	63 \pm 2	32,5 \pm 7	NS
Hombres, n	4	4	3	
Mujeres, n	5	5	3	
Características AR				
Diagnostico, años \pm DS	11 \pm 5	11 \pm 6		NS
DAS28-PCR, score \pm DS	2,96 \pm 0,23	2,88 \pm 0,43		NS
DAS28-VHS, score \pm DS	2,98 \pm 0,18	2,97 \pm 0,30		NS
Corticoides sistemicos, n	9	9		
En uso	8	8		
Suspendido + de 6 meses	1	1		
Falla a DMARDS, n	9	9		
Menos de 2	8	8		
Más de 2	1	1		
Uso actual de Biológicos, n	2	2		
Características Enf. Cardiovascular				
Infarto Agudo al miocardio, n	8	8	0	
Accidente Cerebrovascular, n	1	1	0	
Enf. Arterial oclusiva, n	0	0	0	
Factores de Riesgo Cardiovascular				
Hipertensión arterial, n	8	8	0	
Dislipidemia, n	7	7	0	
HDL, mg/dl \pm DS	35,50 \pm 4,89	38,86 \pm 4,47	45,2 \pm 7,2	NS
Tabaquismo, (IPA) \pm DS	7 \pm 12,25	2,57 \pm 6,8	0	NS
Farmacos				
Estatinas, n	9	7	0	NS

El subset clásico de monocitos presenta mayores niveles de IL-1 β intracelular en condiciones basales y post estimulación con LPS. La presencia del marcador CD163 marca de mejor manera la respuesta a LPS que el marcador CD16.

En una primera etapa, PBMC de sujetos sanos se estimularon con LPS en concentración de 1ug/ml y se compararon, en términos de la fluorescencia media de IL-1 β , entre cada *subset* en el pool total de monocitos CD14+. En (a) se muestra que el *subset* de monocitos clásicos (CD14++CD16-) tienen niveles mayores de IL-1 β intracelular. En (b), posterior a la estimulación con LPS por 2 horas, los niveles de IL-1 β intracelular aumentan en todos los *subsets* manteniéndose significativamente mayores en el clásico respecto al no clásico (CD14+CD16++), descrito en la literatura como el de perfil más inflamatorio en términos del perfil de citoquinas producidas. En línea con estos resultados no esperados, en (c) el análisis de los marcadores CD16 y CD163 con relación a los niveles de IL-1 β intracelular, muestran que este último se relaciona de mejor con lo esperado a un marcador del perfil M2 o no inflamatorio. Se observa que la presencia del marcador CD16 (determinante con el *subset* inflamatorio o no clásico) no coincide con los *peak* en las mediciones de IL-1 β , situación que sí es posible ver en contexto de negatividad para el marcador CD163, dando espacio a una mejor correlación entre la clasificación moderna M1, M2 descrita por Hou(64) (que incluye a CD163) y los niveles de IL-1 β intracelular en monocitos circulantes.

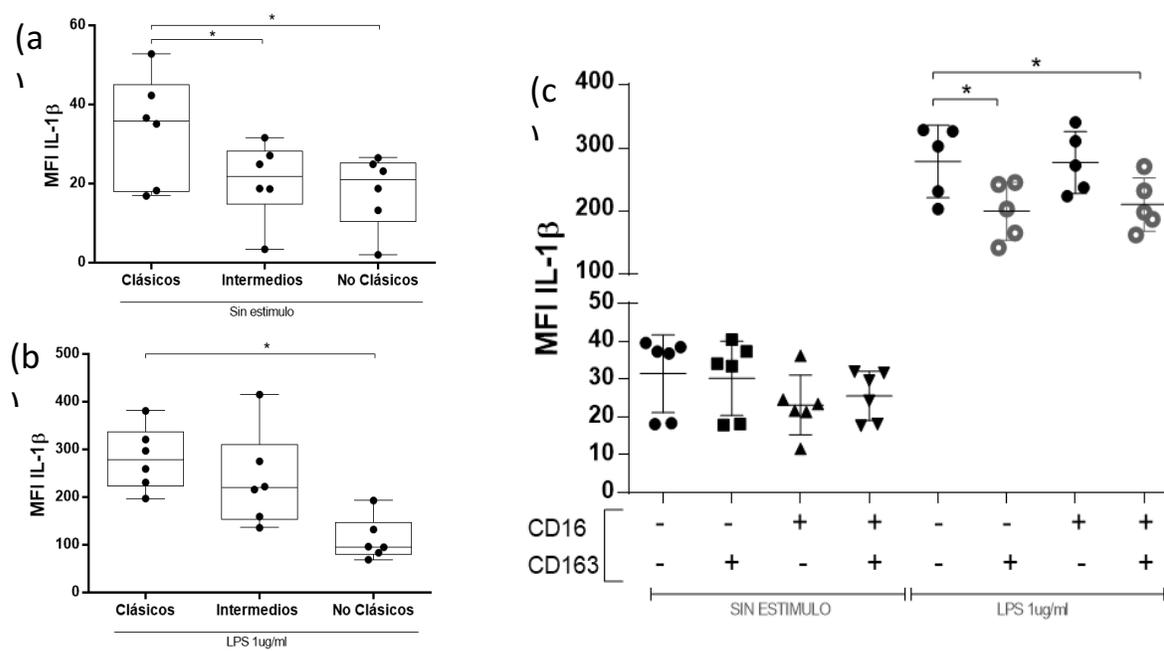


Figura 1: Niveles de IL-1 β intracelulares en subsets de monocitos en condiciones basales y estimulación con LPS y su relación con marcador CD163.

(a) Intensidad de fluorescencia media de IL-1 β intracelular en monocitos de cada *subset* según la clasificación de Ziegler en condiciones sin estimulación. Se muestran todos los valores, mínimo y máximo y p 25-75. Se encuentran diferencias significativas entre los grupos según Test t de Student no pareado C-I ($p < 0,02$), C-NC ($p < 0,01$). (b) Intensidad de fluorescencia media de IL-1 β intracelular en monocitos de cada *subset* según la clasificación de Ziegler en condiciones de estimulación con LPS 1 μ g/ml por 2 horas. Se encuentran diferencias significativas entre el *subset* clásico y no clásico ($p < 0,02$) con test de t de Student no pareado. (c) Intensidad de fluorescencia media de IL-1 β intracelular en monocitos CD14++ según presencia o ausencia de marcadores CD16 y CD163. En condiciones de estimulación con LPS, se encontró diferencias significativas entre grupo CD163+ y CD163-. CD16-CD163- , CD16-CD163+ ($p < 0,02$), CD16+CD163-, CD16+CD163+ ($p < 0,03$) con test de t de Student no pareado.

Los pacientes con AR tienen mayor expresión IL-1 β e IL-6 intracelular. Esta mayor expresión se observa sólo en el subset clásico

Siguiendo los resultados vistos *in vitro* en sujetos sanos donde se pesquisó que el *subset* clásico de monocitos es el que tiene los niveles mayores de IL-1 β intracelular, evaluamos los niveles de citoquinas inflamatorias IL-1 β e IL-6. En (a) y (b) se observa que los niveles de IL-1 β e IL-6 nuevamente resultan significativamente mayores en el *subset* clásico de monocitos circulantes tanto en el grupo de sujetos sanos como en el grupo de pacientes con AR totales. En (c) y (d) se analizan los mismos niveles de citoquinas intracelulares separando el grupo de pacientes AR en aquellos con y sin eventos cardiovasculares previos. En ambos paneles se observa que los niveles de citoquinas son significativamente mayores en pacientes con AR respecto a sujetos sanos, independiente de la ocurrencia de ECV previos. Estos resultados se repiten también solo en el *subset* clásico.

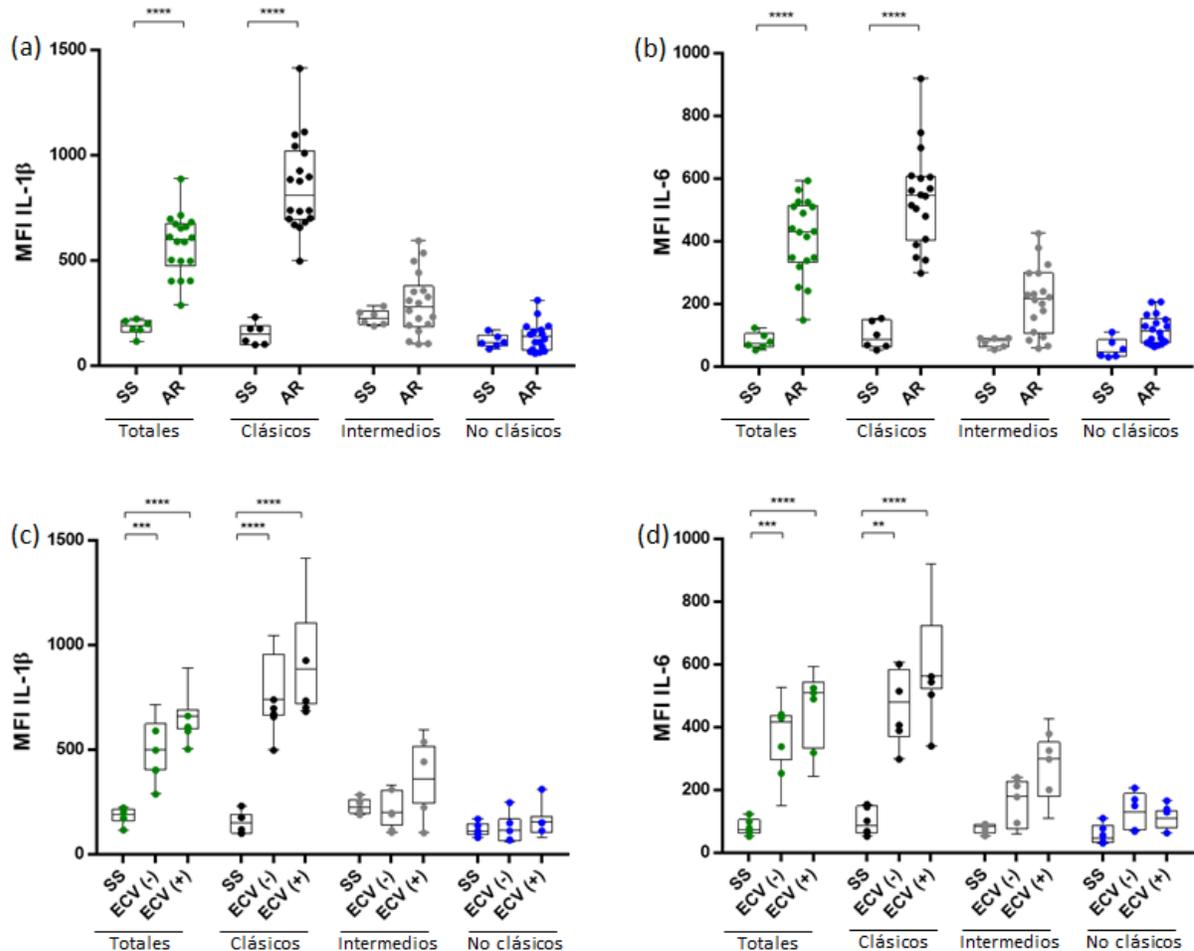


Figura 2: Niveles basales de interleuquinas inflamatorias intracelulares en monocitos totales y subsets en pacientes con AR y sujetos sanos.

En (a) y (b) se muestran niveles de IL-1 β e IL-6 intracelular en AR y sujetos sanos (****p=0,0001). Existe significativamente más interleuquinas en población de monocitos totales y clásicos. Al analizar por separado a aquellos pacientes con AR sin y con ECV se muestra que no hubo diferencias entre ambos subgrupos (c) y (d) (**p=0,001), (**p=0,01). Todas las comparaciones realizadas con ANOVA de 2 vías.

El fenotipo M1 está aumentado en pacientes con AR y principalmente en el subgrupo de pacientes con ECV previo

Luego de los resultados obtenidos en la figura 1 y figura 2 donde tanto in vitro en condiciones basales y estimulación, como in vivo en pacientes con AR y sujetos sanos; el *subset* que según literatura corresponde al menos inflamatorio es el que presenta mayores niveles de IL-1 β e IL-6 intracelular, decidimos utilizar la clasificación de monocitos en fenotipos M1 y M2 según lo descrito por Hou(64). Esta elección se sustentó además en que CD163 se relaciona mejor con los *peak* y valles en los niveles de IL-1 β intracelular post estimulación con LPS.

Los monocitos M1, definidos como aquellos CD14+HLA-DR+CCR2+, están aumentados en pacientes con AR respecto a sujetos sanos como se ve en (a). Al separarlos en los subgrupos con y sin ECV se puede ver que la diferencia se mantiene solo en el grupo con ECV respecto al grupo sin ECV, demostrando que la diferencia entre AR y sujetos sanos es acosta del grupo con ECV previos (b).

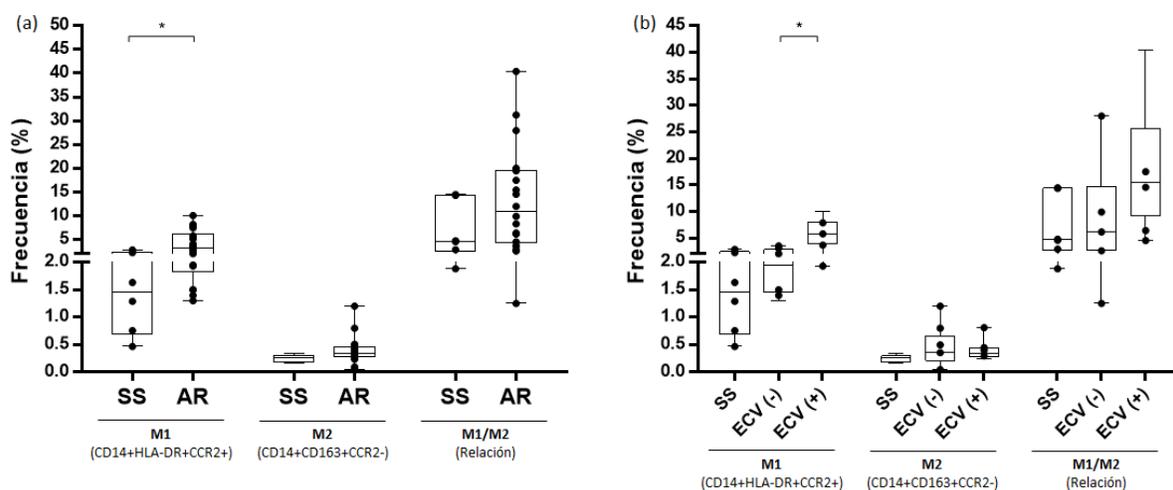


Figura 3: Frecuencia de monocitos M1 y M2 y su relación en pacientes con AR con y sin ECV.

En (a) se grafica la frecuencia de monocitos M1, M2 y relación M1/M2 en pacientes AR y sujetos sanos. Se observa diferencias significativas en el grupo de pacientes con AR respecto a sujetos sanos (*p=0,01). En (b) se muestran las mismas poblaciones en pacientes AR divididos por presencia o ausencia de ECV. Existe diferencias significativas de frecuencia M1 entre subgrupo ECV (+) y ECV(-). (*p=0,02). Todas las comparaciones realizadas con ANOVA de 2 vías.

El subgrupo de pacientes AR con ECV tiene mayor expresión de IL-1 β e IL-6 y en todos los grupos M1 mayor que M2

Se analizó los niveles de interleuquinas inflamatorias intracelulares en monocitos clasificados de acuerdo a fenotipos M1 y M2. En (a) se observa que los niveles de IL-1 β en monocitos M1 son mayores en el subgrupo de pacientes con AR con eventos cardiovasculares previos. En el fenotipo M2 se observan diferencias similares, pero en niveles significativamente menores que en M1. Para IL-6 las diferencias encontradas en IL-1 β se repiten, demostrando también mayores niveles en aquellos monocitos M1 de pacientes con AR y ECV previos y significativamente mayores a M2 (b). Estos resultados muestran que el máximo de interleuquinas inflamatorias se observa en el grupo de monocitos M1 de pacientes con AR y ECV previos.

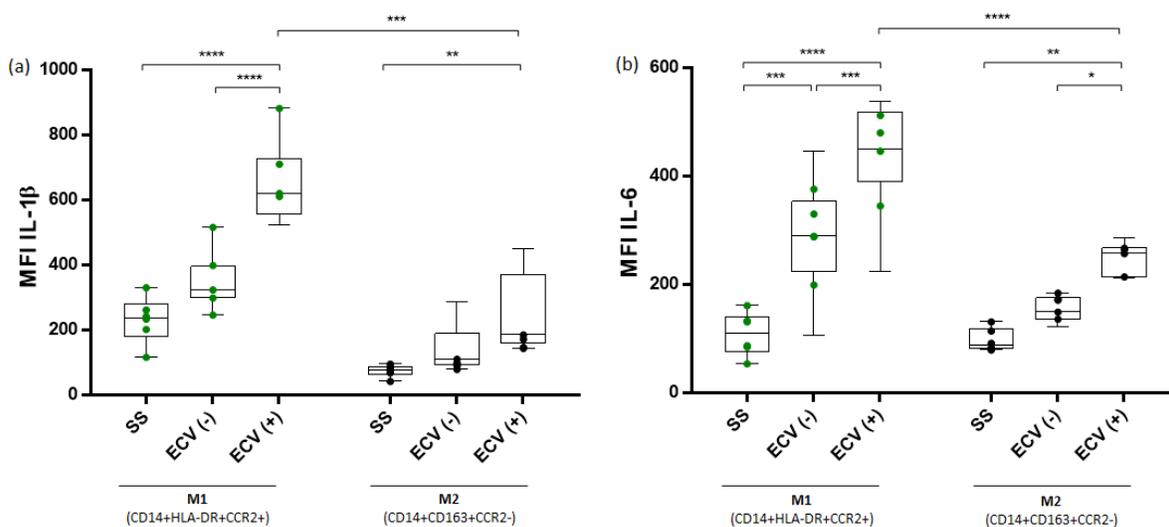


Figura 4: Niveles de interleuquinas inflamatorias intracelulares en monocitos M1 y M2 de pacientes con AR y sujetos sanos.

En panel (a) se muestran niveles de IL-1 β en subgrupos y diferentes fenotipos. Los valores son máximos en aquellos monocitos M1 de pacientes con AR y ECV previos (****p=0,0001), (***p=0,001), (**p=0,03). En (b) se muestran los niveles de IL-6 en los mismos grupos. Nuevamente los valores son máximos en el grupo de monocitos M1 de pacientes con AR con ECV previos (****p=0,0001), (***p=0,001), (**p=0,03), (*p=0,02). Todas las comparaciones realizadas con ANOVA de 2 vías.

La expresión de IL-1 β se correlaciona positivamente con frecuencia de monocitos M1 y relación M1/M2 en pacientes AR

Conociendo que el grupo de monocitos M1 de pacientes con AR y ECV son los de mayores niveles de IL-1 β e IL-6 intracelular, quisimos analizar si existen correlaciones significativas entre ambos parámetros. En (a) se observa que la frecuencia relativa de monocitos M1 en pacientes con AR se correlaciona positiva y significativamente con los niveles de IL-1 β . Al contrario, la frecuencia de monocitos M2 en el mismo grupo, se correlaciona negativa y significativamente con los niveles de IL-1 β (b). En (c) la relación de frecuencias M1/M2 en pacientes con AR se correlaciona positiva y muy significativamente con los niveles de IL-1 β dando sustento a la fenotipificación moderna y a su relación con el estatus inflamatorio. Cuando se repitió el análisis con IL-6 las tendencias se mantienen sin lograr significancia estadística. (d, e y f).

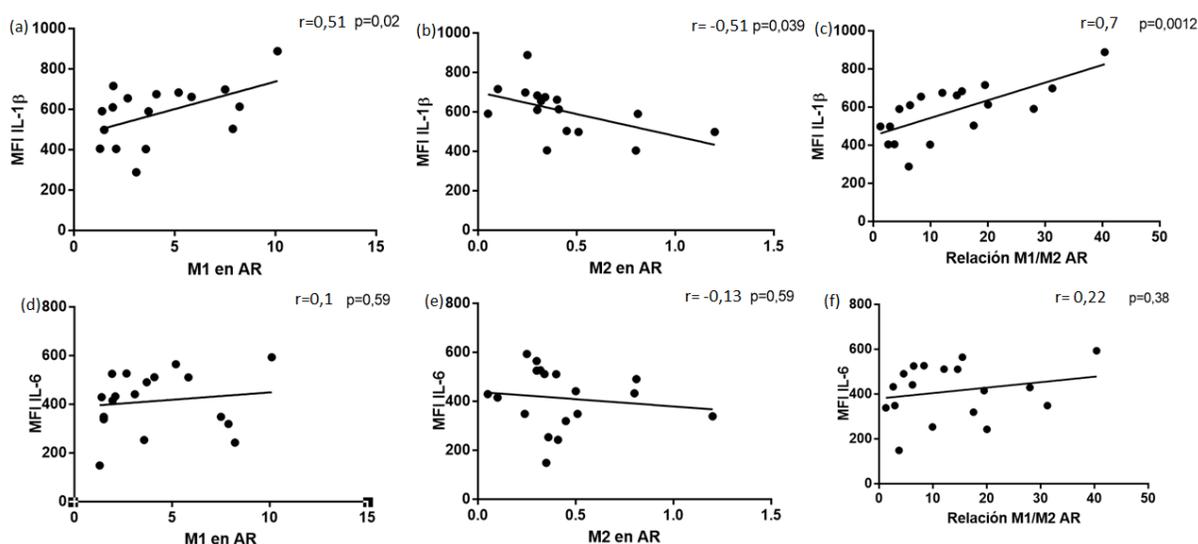


Figura 5: Correlación entre interleuquinas inflamatorias intracelulares y fenotipo de monocitos en pacientes con AR.

En panel (a, b y c) se muestran correlaciones entre niveles de IL-1 β y frecuencia de monocitos M1, M2 y relación M1/M2. Se observa correlación positiva y significativa en M1 y relación M1/M2 ($r=0,51$ $p=0,02$), ($r=0,7$ $p=0,0012$), por el contrario, negativa y significativa para M2 ($r=-0,51$ $p=0,039$). En (d, e y f) se muestra el mismo análisis para IL-6 sin lograr significancias. Análisis de correlación con Test de Pearson.

La expresión de IL-1 β se correlaciona positivamente con relación M1/M2 sólo en pacientes AR con ECV.

Dado que los M1 y M2 se correlacionan según lo esperado con los niveles de interleuquinas inflamatorias intracelulares en pacientes con AR, se analizó cómo se comporta la relación de frecuencias M1/M2 en los subgrupos con y sin ECV. Demostramos que sólo el subgrupo ECV (+) se correlaciona positiva y significativamente con los niveles de IL-1 β (a y b) sugiriendo que el fenotipo M1 de monocitos posee características inflamatorias particulares en este subgrupo de pacientes.

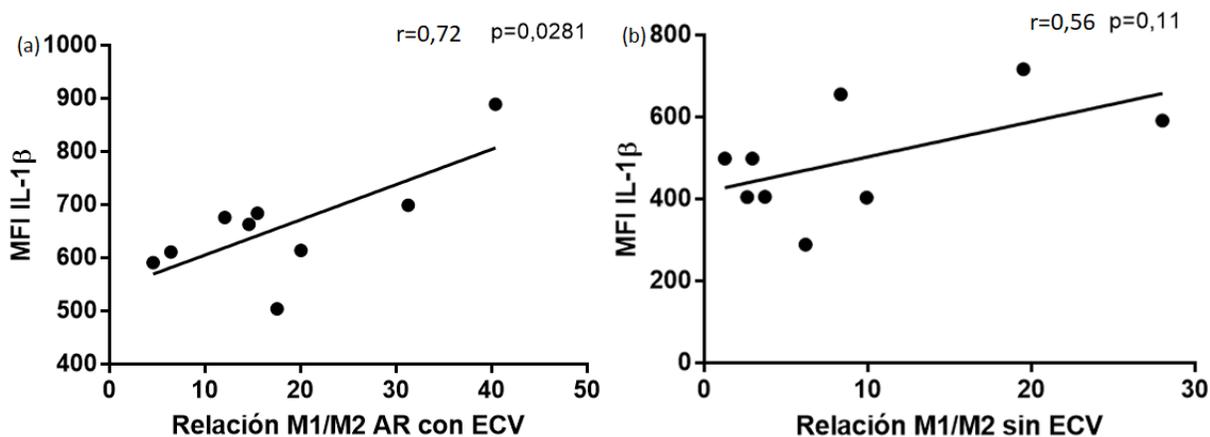


Figura 6: Correlación entre IL-1 β y relación M1/M2 en pacientes con AR con y sin ECV.

En panel (a) se muestra correlación positiva entre niveles de IL-1 β y relación M1/M2 en pacientes con AR con ECV ($r=0,72$ $p=0,0281$). En (b) correlación positiva, pero sin significancia en subgrupo sin ECV. Análisis de correlación con Test de Pearson.

Relación M1/M2 y niveles de citoquinas intracelulares no se correlacionan con inflamación clínica ni duración de la enfermedad

Considerando que en la literatura razonablemente se les atribuye a factores clínicos propios de la enfermedad el mayor riesgo cardiovascular, analizamos la correlación entre los valores de DAS28-PCR (evaluación clínica del estatus inflamatorio en AR) al momento de la toma de la muestra, con los niveles de IL-1 β y la relación M1/M2 de monocitos circulantes. En (a) y (b) se puede observar que no existe correlación significativa entre estos factores y el DAS28-PCR. Además, la duración de la enfermedad tampoco fue determinante de diferencias en IL-1 β y relación de fenotipos monocitarios (c) sugiriendo en conjunto que existe un factor adicional, no considerado previamente, que participa de este estatus inflamatorio aumentado definido por aumento de la relación M1/M2 y mayores niveles de IL-1 β intracelular en pacientes con AR con ECV previos.

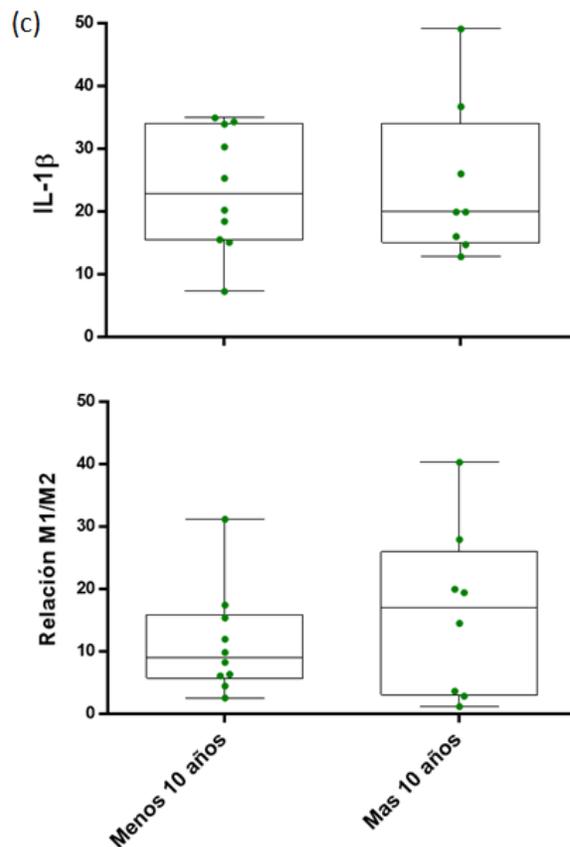
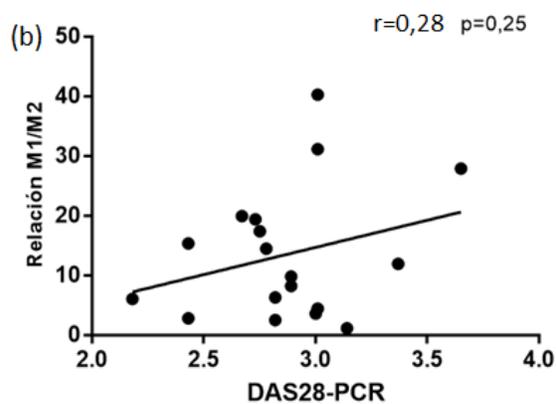
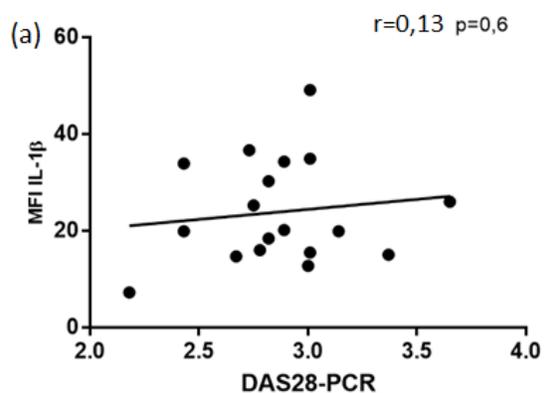


Figura 7: Relación entre parámetros de severidad clínica de la AR y estatus inflamatorio de monocitos circulantes.

En panel (a y b) se muestra correlación sin significancia estadística entre niveles de IL-1 β y relación M1/M2 y DAS28-PCR en pacientes con AR. En (c) la duración de la enfermedad no diferencia niveles de IL-1 β ni relación M1/M2 de monocitos circulantes en estos pacientes. Análisis con test de Pearson y t de Student.

La actividad de mTORC medida por S6R fosforilado está aumentada en pacientes con AR respecto de sujetos sanos, pero es mayor aún en el subgrupo con ECV. Además, actividad de mTORC está aumentada en M1 y M2 en AR con ECV

Establecido que los niveles de interleuquinas inflamatorias en monocitos de pacientes con AR está aumentado y que este es acosta principalmente del subgrupo con ECV previos, analizamos la fosforilación de la proteína S6R, quinasa importante en la activación de tanto mTORC 1 como mTORC2, en este subgrupo con respecto a ECV (-) y sujetos sanos. En (a) se muestra que los niveles de S6Rp en pacientes con AR respecto a sujetos sanos es significativamente mayor y que esta depende, una vez más, del subgrupo con AR con ECV previos. Cuando analizamos los niveles de S6R fosforilado en los fenotipos M1 y M2 en todos los subgrupos observamos que, al igual que los niveles de IL-1 β e IL-6, S6Rp alcanza un máximo en el subgrupo de pacientes con AR con ECV previos. Estos datos sugieren que la mayor fosforilación de proteínas de la vía de mTORC podría jugar un rol en el estatus inflamatorio de monocitos circulantes en estos pacientes.

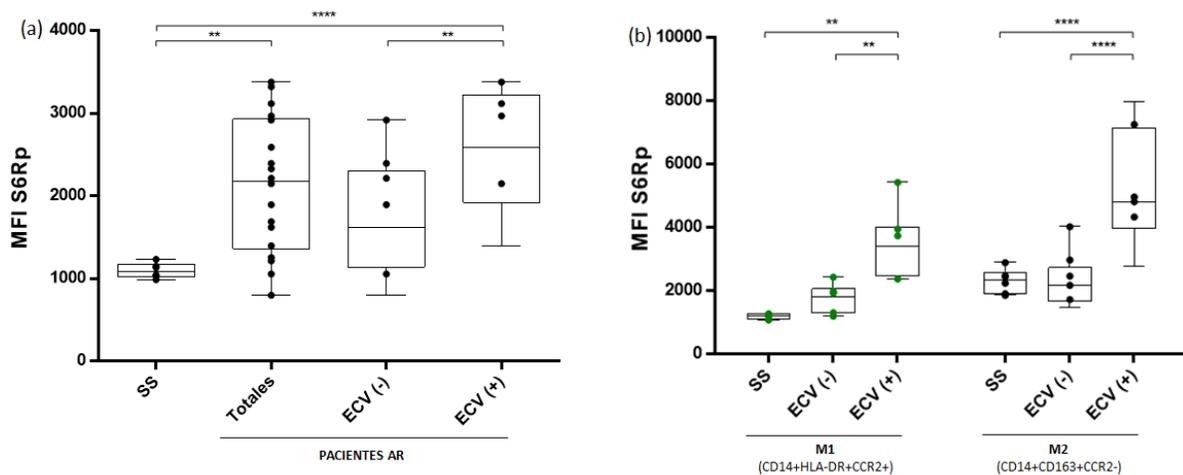


Figura 8: Niveles de S6R fosforilado intracelular en monocitos de pacientes con AR con y sin ECV.

En panel (a) niveles de S6Rp en pacientes AR y subgrupos con y sin ECV. Se observan diferencias significativas en subgrupo ECV (+). En (b) se observa que los niveles de S6Rp son máximos en el subgrupo ECV (+) tanto en fenotipo M1 como M2 de monocitos. (****p=0,0001, **p= 0,01), (****p=0,0001, **p=0,009). Todas las comparaciones realizadas con ANOVA de 2 vías.

El flujo autofágico esta aumentado en pacientes con AR respecto a sujetos sanos. En el grupo de pacientes AR, los con ECV tienen mayores niveles de BECLIN1 plasmático.

Habiendo demostrado que tanto la frecuencia de monocitos M1, como los niveles de IL-1 β y S6Rp intracelular están aumentados en pacientes con AR con ECV respecto a aquellos sin ECV; quisimos estudiar cómo se encuentra el flujo autofágico, medido en plasma, en este grupo de pacientes. En estudios *in vivo* la medición plasmática del flujo autofágico mediante ELISA para Beclin1 y LC3b es la técnica más usada. Realizamos entonces mediciones de ambas proteínas del flujo autofágico en pacientes con AR y sujetos sanos. En (a y b) se observa que los niveles plasmáticos de Beclin1 y LC3b son significativamente mayores en pacientes con AR respecto a sujetos sanos y que este es particularmente alto en el subgrupo con ECV previos. Para LC3b las diferencias respecto a sujetos sanos son similares (c y d), logrando también un máximo en el subgrupo ECV (+).

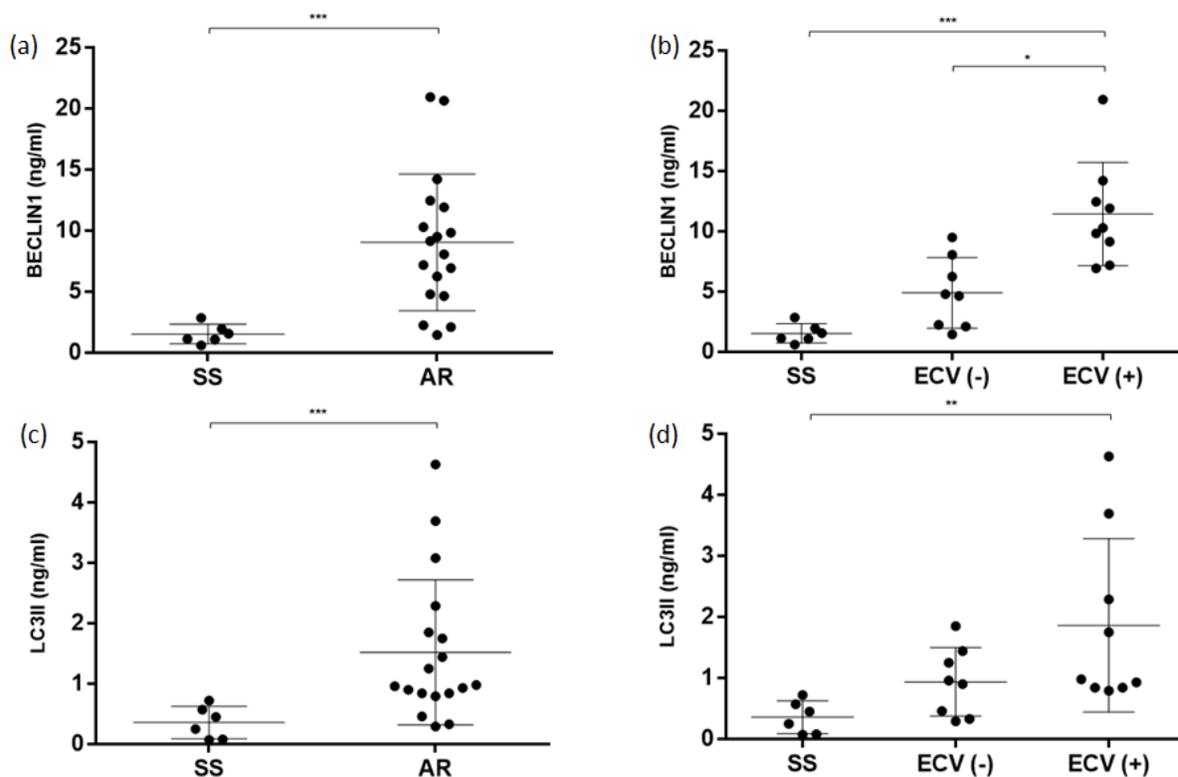


Figura 9: Flujo autofágico plasmático en pacientes con AR con y sin ECV previos.

En panel (a) niveles plasmáticos de Beclin1 medido por ELISA en pacientes con AR y sujetos sanos. En (b), subgrupo de pacientes ECV (+) alcanza el un máximo significativo de Beclin1 plasmático (** $p=0,001$, * $p=0,02$). En (c y d) se realizó el mismo análisis para niveles de LC3b plasmático observando significancia estadística en grupo de pacientes con AR y en AR con ECV respecto a sujetos sanos. (** $p=0,001$, ** $p=0,009$). Todas las comparaciones realizadas con ANOVA de 2 vías.

BECLIN1 muestra correlación con IL-1 β intracelular de monocitos circulantes en pacientes con AR

Dado que la medición de autofagia se realiza en plasma y no es posible conocer mediante esta medición en qué tipos celulares se encuentra particularmente aumentada, analizamos la correlación de este valor plasmático con los niveles intracelulares de IL-1 β e IL-6 en monocitos circulantes. En (a) se muestra que, en pacientes con AR, los niveles de IL-1 β intracelular de monocitos se correlaciona positiva y significativamente con los niveles plasmáticos de Beclin1. En (b) se muestra la misma tendencia para IL-6 pero sin significancia estadística. Estos datos sugieren que, si bien no es posible conocer el estado del proceso autofágico intramonocitario, el estatus inflamatorio intracelular de estos concuerda con el grado de activación de la autofagia en sangre.

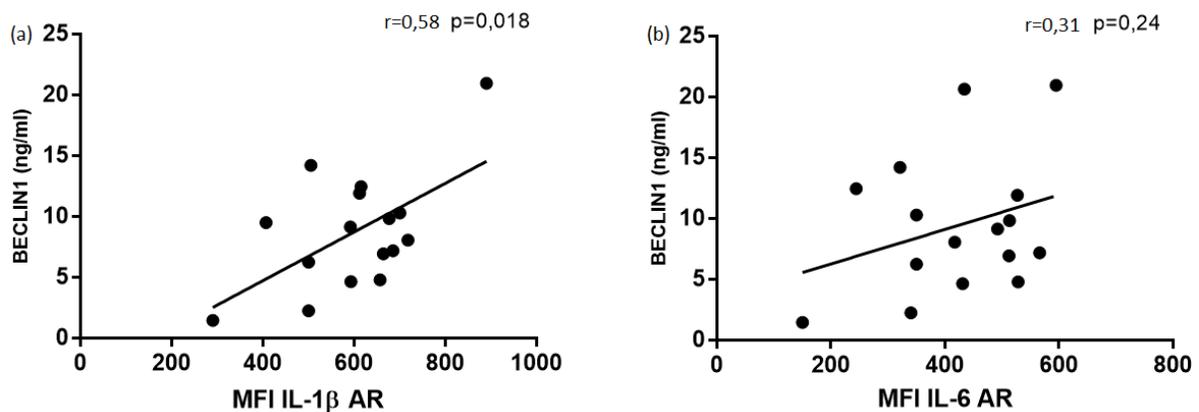


Figura 10: Correlación entre autofagia en plasma y niveles intracelulares de interleuquinas inflamatorias.

En panel (a) correlación entre niveles plasmáticos de Beclin1 e IL-1 β intramonocitario en pacientes con AR. Se observa correlación positiva y significativa. ($r=0,58$, $p=0,018$). En (b) la correlación entre Beclin1 e IL-6 es positiva pero no alcanza significancia estadística. Analizado con Test de Pearson.

Estatus inflamatorio y fenotipo de monocitos circulantes en pacientes con AR con ECV previos

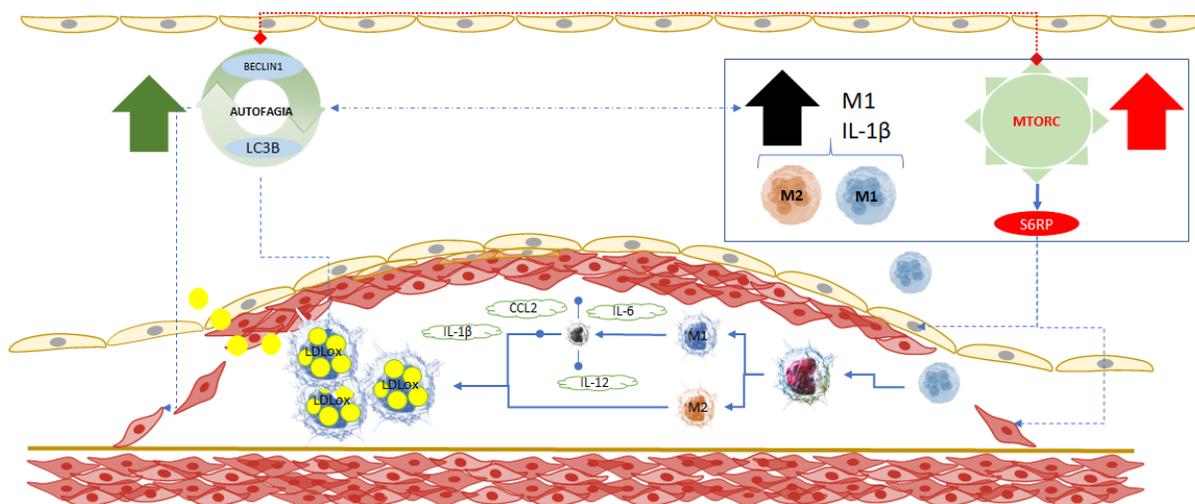


Figura 11: Resumen del estatus inflamatorio y fenotipo de monocitos circulantes en pacientes con AR con ECV previos.

Los monocitos circulantes de pacientes con AR con historia de ECV muestran una expansión relativa de su fenotipo M1. A su vez, los monocitos de estos pacientes contienen niveles mayores de IL-1 β intracelular y mayor cantidad de proteína S6R fosforilada.

Los niveles plasmáticos de proteínas del flujo autofágico como Beclin1 y LC3b, están aumentados en estos pacientes y sus niveles se correlacionan con el estatus inflamatorio intramonocitario medido por IL-1 β .

En conjunto, estos datos permiten suponer un contexto inflamatorio y fenotípico especial de monocitos en pacientes con AR que se presentan con ECV el que podría estar modulado al menos en parte por actividad de mTORC y flujo autofágico.

6. Discusión

La clasificación de monocitos en 3 *subset* de acuerdo con su expresión en membrana de CD14 y CD16 es relativamente reciente y hasta el momento contradictoria en términos de la funcionalidad a la que éstos se asocian(60). Existen escasos trabajos abocados de respaldar la asociación de un determinado *subset* con funcionalidad ya sea por perfil de citoquinas producidas o actividad fagocítica. Mucho de lo actualmente conocido en este ámbito se basa ya sea en experiencias anecdóticas u opinión de expertos o extrapolación de experimentos en ratones o macrófagos humanos(60).

La participación de cada *subset* en enfermedad ha sido más explorada(84). Mientras que en algunas patologías como AR o Lupus se describe aumento del *subset* intermedio, en otras se describen cambios contrarios o incongruentes(85). El escaso respaldo funcional a la clasificación y la, a veces, discordante descripción del comportamiento de *subset in vivo* no permiten hasta el momento una clasificación integral y definitiva para caracterización de monocitos circulantes.

La mayor parte de los estudios clínicos disponibles actualmente intentan asociar cambios en un determinado *subset* con noxas inflamatorias agudas y crónicas, con resultados que, hasta el momento, no son sistematizables. Otro grupo de estudios se ha centrado en la caracterización de los 3 *subsets* en términos de capacidad fagocítica en contexto de monocitos diferenciados, y de expresión de marcadores de superficie(86). Si bien se ha comenzado a caracterizar de manera satisfactoria el fenotipo de cada uno de estos subgrupos, ha sido imposible demostrar un comportamiento sistemático de cada uno de ellos frente a un estímulo determinado(59).

Pudimos demostrar que en monocitos de sujetos sanos en condiciones basales y en estimulación con LPS, el *subset* clásico, descrito en la literatura como no inflamatorio, responde con niveles mayores de IL-1 β intracelular. Además, estos resultados se replican en pacientes con AR y sujetos sanos y son concordantes con los resultados de otra Interleuquina inflamatoria como es IL-6. En conjunto esto nos demuestra que la clasificación de Ziegler 2010(50) deja poco claro el comportamiento inflamatorio de los diferentes *subsets* con relación a las interleuquinas producidas. Si bien la medición de interleuquinas intracelulares por citometría no necesariamente determina el estatus inflamatorio del monocito, corresponde a una buena aproximación y ampliamente utilizada(52, 64).

CD163 se relacionó mejor con los peak de IL-1 β intracelular en la fase *in vitro* de nuestro estudio. En los últimos años, CD163 se posicionó como uno de los marcadores que, frente a negatividad, clasifican monocitos en fenotipo M2(59).

En 2018, utilizando otras técnicas como CyTOF y análisis de reducción dimensional (tSNE) se logró dar respaldo a marcadores previamente mencionados como adecuados para la caracterización de diferentes subgrupos de monocitos(59). En trabajos recientes, los marcadores HLA-DR (CD68) y CCR2 resultaron de vital importancia al diferenciar subgrupos con posibles diferencias funcionales. (61)

Incorporando todos los cambios en la clasificación y comportamiento esperado de monocitos circulantes antes mencionados, además de nuestros experimentos previos de estimulación inflamatoria *in vitro*, pudimos establecer la relación de subpoblaciones CD14+HLA-DR+CCR2+/CD14+CD163+CCR2- como la mejor subclasificación disponibles hasta el momento. La incorporamos al análisis inicialmente propuesto por Williams et al.(62) y lo comparamos en todos los experimentos. Cabe mencionar que en el proceso de selección de las poblaciones M1 y M2 realizando *gating* por CD14+ inicial, al menos en nuestra aproximación, los monocitos no clásicos son sistemáticamente eliminados del análisis.

Fuimos entonces capaces de demostrar que la clasificación habitual basada en CD14 y CD16, no se comporta de manera predecible en la comparación de pacientes con AR con y sin ECV. Como anteriormente se ha descrito, sólo se observó expansión del *subset* intermedio en pacientes con AR respecto a sujetos sanos, sin embargo, más allá de este cambio los resultados nuevamente no permiten mayor sistematización.

Cuando realizamos el análisis mediante fenotipos M1 y M2 utilizando nuevos marcadores, demostramos que en pacientes con ECV la frecuencia M1 de monocitos está aumentada. Este hallazgo es relevante ya que nos permite hipotetizar que Las primeras etapas de la AR, y quizás antes que los monocitos colonicen la placa, tienen un perfil “inflamatorio” favorecedor del proceso de ateromatosis acelerada. Interesantemente, las interleuquinas del perfil inflamatorio como IL-1 β e IL-6 están también significativamente aumentadas en el grupo de estudio y particularmente IL-1 β logra correlación positiva y significativa con la frecuencia de monocitos M1 y la relación M1/M2 de monocitos circulantes.

Propusimos a mTORC como un *switch* de la fenotipificación de monocitos circulantes considerando su importancia en la adaptación celular a noxas externas y su rol en la destinación celular(66). Demostramos que los niveles de la proteína S6R fosforilada, que

reúne actividad de los complejos mTORC1 y mTORC2, están aumentados en pacientes con AR y ECV en la misma forma que la frecuencia de M1 y las interleuquinas inflamatorias intracelulares. Si bien la sola fosforilación medida por citometría intracelular no es capaz de demostrarnos delta de actividad, se encuentra sistemáticamente aumentada en monocitos de cualquier fenotipo en pacientes con AR y ECV. Por ahora suponemos que mTORC tiene participación en la fenotipificación de monocitos circulantes sin embargo hasta el momento hemos sido capaces de mostrar comportamientos concordantes, pero sin causalidad.

Dada la relación entre mTORC y autofagia en la adaptación y destinación celular(87), además de su inhibición cruzada, analizamos los niveles de autofagia plasmática para determinar concordancia entre valores y diferentes subgrupos de pacientes. En la literatura, la medición de autofagia in vivo en patología se realiza preferentemente mediante ELISA en sangre más que con citometría(81). Técnicamente, el análisis citométrico de la autofagia tiene dificultades ya que los anticuerpos disponibles no siempre cubren las proteínas relacionadas con el proceso completo del flujo autofágico como Beclin1 y LC3(88). Decidimos replicar los experimentos en pacientes con ACV donde se midió autofagia en sangre con buenos resultados(81). Demostramos que los niveles están aumentados en pacientes con AR y preferentemente en pacientes con ECV previos siguiendo el patrón de las citoquinas, M1 y S6Rp. Dada la incapacidad de asociar esta activación al compartimiento monocitario circulante, correlacionamos satisfactoriamente los niveles intracelulares de IL-1 β en monocitos y los niveles plasmáticos de Beclin1 lo que nos permite hipotetizar participación de esta en el proceso de fenotipificación.

Finalmente, si bien es imposible asegurar un rol de mTORC o autofagia en la fenotipificación de monocitos en pacientes con AR y ECV, pudimos demostrar que la clasificación fenotípica en M1 y M2 tiene mayor concordancia con un proceso inflamatorio intracelular en monocitos, y que estos están sobrerrepresentados en pacientes con AR con ECV previos. Las correlaciones que posicionan a S6Rp y proteínas plasmáticas de la autofagia en la misma “dirección” que los hallazgos descritos, abren espacio a discutir posibles mecanismos de fenotipificación en “tiempo real” de monocitos circulantes antes de alcanzar la placa. Se requerirán otros modelos de estudio y cohortes prospectivas que permitan utilizar los hallazgos acá presentados como estrategias de detección precoz o posibles targets terapéuticos.

7. Limitaciones del estudio

La fenotipificación de monocitos ha sido difícil dada la inconsistencia entre las diferentes clasificaciones disponibles y su correlato con la funcionalidad. Nosotros utilizamos medición de interleuquinas intracelulares como testigo del perfil de activación en las diferentes condiciones, guiándonos por la literatura disponible en relación con la elección de citoquinas que utilizamos. Solo pudimos incorporar a IL-1 β e IL-6, ambas de perfil inflamatorio, en nuestros experimentos. Hubiese sido de interés la medición de citoquinas de perfiles alternativos como IL-10 e IL-4, u otras también relacionadas con la activación proinflamatoria como TNF- α . La limitación que no nos permitió incorporar estas mediciones fue el número de canales disponibles en los citómetros que utilizamos. Destinamos la mayor cantidad de canales a la fenotipificación, ya que este es el ítem de mayor discusión en la literatura. Sería interesante repetir algunos de estos experimentos con un perfil más amplio de citoquinas que permitan definir mejor el perfil intracelular de cada monocito en cada subgrupo.

Cuando analizamos activación de mTORC decidimos medir la cantidad de proteína S6R fosforilada intracelular como marcador. Con esta aproximación pudimos correlacionar mejor los parámetros medidos en cada célula y por lo tanto en cada subpoblación. También limitado por el número de canales disponibles en el citómetro, no medimos los niveles basales de S6R y por lo tanto no podemos demostrar el delta de activación que nos permitiría asegurar de mejor manera el cambio y por lo tanto la activación propiamente tal. Una posibilidad es utilizar Western Blott para análisis de este parámetro, idea que mantenemos para futuros análisis de estas poblaciones. No fue incorporado en este estudio disponibilidad limitada de muestra.

En la literatura, la autofagia ha sido medida preferentemente por ELISA en plasma en humanos en contexto *in vivo*. Existe la medición intracelular por citometría de los componentes del flujo autofágico, sin embargo, hay poca información disponible y mayormente en líneas celulares de origen murino. Manteniendo la idea de preferir el modelo humano y la literatura que respaldara estas mediciones, decidimos medir autofagia en plasma. Con esto dificultamos por un lado la correlación de este factor con las interleuquinas y S6Rp medido intramonocitario por citometría, pero por otro pudimos

apoyar mejor los resultados en la literatura. Ahora que conocemos la actividad autofágica “circulante” en estos pacientes, tenemos planificado mediciones intracelulares por citometría que podamos validar con los resultados ya obtenidos en plasma.

8. Referencias

1. Anderson KO, Bradley LA, Young LD, McDaniel LK, Wise CM. Rheumatoid arthritis: review of psychological factors related to etiology, effects, and treatment. *Psychol Bull.* 1985 Sep;98(2):358-87.
2. Conigliaro P, Chimenti MS, Triggianese P, Sunzini F, Novelli L, Perricone C, et al. Autoantibodies in inflammatory arthritis. *Autoimmun Rev.* 2016 Mar 9.
3. Suzuki A, Yamamoto K. From genetics to functional insights into rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2015 Jul-Aug;33(4 Suppl 92):S40-3.
4. Pujades-Rodriguez M, Dux B, Thomas SL, Stogiannis D, Rahman A, Smeeth L, et al. Rheumatoid Arthritis and Incidence of Twelve Initial Presentations of Cardiovascular Disease: A Population Record-Linkage Cohort Study in England. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151245.
5. Combe B, Logeart I, Belkacemi MC, Dadoun S, Schaeffer T, Daures JP, et al. Comparison of the long-term outcome for patients with rheumatoid arthritis with persistent moderate disease activity or disease remission during the first year after diagnosis: data from the ESPOIR cohort. *Ann Rheum Dis.* 2015 Apr;74(4):724-9.
6. Humphreys JH, Warner A, Chipping J, Marshall T, Lunt M, Symmons DP, et al. Mortality trends in patients with early rheumatoid arthritis over 20 years: results from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2014 Sep;66(9):1296-301.
7. Michaud K, Berglind N, Franzen S, Frisell T, Garwood C, Greenberg JD, et al. Can rheumatoid arthritis (RA) registries provide contextual safety data for modern RA clinical trials? The case for mortality and cardiovascular disease. *Ann Rheum Dis.* 2016 Feb 8.
8. Castaneda S, Martin-Martinez MA, Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Garcia-Yébenes MJ, Perez-Vicente S, et al. Cardiovascular morbidity and associated risk factors in Spanish patients with chronic inflammatory rheumatic diseases attending rheumatology clinics: Baseline data of the CARMA Project. *Semin Arthritis Rheum.* 2015 Jun;44(6):618-26.
9. Meune C, Touzé E, Trinquart L, Allanore Y. High risk of clinical cardiovascular events in rheumatoid arthritis: Levels of associations of myocardial infarction and stroke through a systematic review and meta-analysis. *Archives of Cardiovascular Diseases.* 2010;103(4):253-61.
10. Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. *Arthritis & Rheumatism.* 2008;59(12):1690-7.
11. Chung W-S, Lin C-L, Peng C-L, Chen Y-F, Lu C-C, Sung F-C, et al. Rheumatoid arthritis and risk of acute myocardial infarction—A nationwide retrospective cohort study. *International Journal of Cardiology.* 2013;168(5):4750-4.
12. van Halm VP, Peters MJ, Voskuyl AE, Boers M, Lems WF, Visser M, et al. Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study, the CARRE Investigation. *Ann Rheum Dis.* 2009 Sep;68(9):1395-400.
13. Peters MJ, van Halm VP, Voskuyl AE, Smulders YM, Boers M, Lems WF, et al. Does rheumatoid arthritis equal diabetes mellitus as an independent risk factor for cardiovascular disease? A prospective study. *Arthritis Rheum.* 2009 Nov 15;61(11):1571-9.

14. van Sijl AM, van den Oever IA, Peters MJ, Boers M, Dijkmans BA, van Halm VP, et al. Subclinical renal dysfunction is independently associated with cardiovascular events in rheumatoid arthritis: the CARRE Study. *Ann Rheum Dis*. 2012 Mar;71(3):341-4.
15. Greenland P, Abrams J, Aurigemma GP, Bond MG, Clark LT, Criqui MH, et al. Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: noninvasive tests of atherosclerotic burden: Writing Group III. *Circulation*. 2000 Jan 4;101(1):E16-22.
16. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2007 Jun;28(12):1462-536.
17. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med*. 1998 Feb 15;128(4):262-9.
18. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002 Dec 17;106(25):3143-421.
19. Acevedo M, Tagle R, Kramer V, Arnaiz P, Marin A, Pino F, et al. [Risk factors for a high carotid intima media thickness among healthy adults]. *Rev Med Chil*. 2011 Mar;139(3):290-7.
20. Kramer V, Corbalan R, Berrios X, Navarrete C, Tagle R, Acevedo M. [Carotid intima media thickness and C reactive protein among overweight or obese subjects without metabolic syndrome]. *Rev Med Chil*. 2013 Aug;141(8):1026-33.
21. Acevedo M, Kramer V, Tagle R, Arnaiz P, Corbalan R, Berrios X, et al. [Cardiovascular risk factors among young subjects with high carotid intima media thickness]. *Rev Med Chil*. 2011 Oct;139(10):1322-9.
22. Siniawski. Precisión diagnóstica del espesor íntima-media carotídeo para la detección de aterosclerosis coronaria. Utilidad en la práctica clínica. *Revista Argentina de Cardiología*. 2012 2013;81(2).
23. Koseoglu C, Kurmus O, Ertem AG, Colak B, Bilen E, Ipek G, et al. Association between carotid intima-media thickness and presence of coronary artery disease in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Anatol J Cardiol*. 2015 Nov 25.
24. Ristic GG, Lepic T, Glisic B, Stanisavljevic D, Vojvodic D, Petronijevic M, et al. Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness: impact of anti-inflammatory treatment. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Jun;49(6):1076-81.
25. Ikdahl E, Rollefstad S, Wibetoe G, Olsen IC, Berg IJ, Hisdal J, et al. Predictive Value of Arterial Stiffness and Subclinical Carotid Atherosclerosis for Cardiovascular Disease in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2016 Jun 15.
26. Fryar CD, Chen TC, Li X. Prevalence of uncontrolled risk factors for cardiovascular disease: United States, 1999-2010. *NCHS Data Brief*. 2012 Aug(103):1-8.
27. George MD, Baker JF. The Obesity Epidemic and Consequences for Rheumatoid Arthritis Care. *Curr Rheumatol Rep*. 2016 Jan;18(1):6.
28. Muller R, Kull M, Polluste K, Aart A, Eglit T, Lember M, et al. The metabolic profile in early rheumatoid arthritis: a high prevalence of metabolic obesity. *Rheumatol Int*. 2016 Apr 15.
29. Joseph RM, Movahedi M, Dixon WG, Symmons DP. Smoking-related mortality in patients with early rheumatoid arthritis - a retrospective cohort study using the Clinical Practice Research Datalink. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016 Mar 18.
30. Kannel WB, Feinleib M, McNamara PM, Garrison RJ, Castelli WP. An investigation of coronary heart disease in families. The Framingham offspring study. *Am J Epidemiol*. 1979 Sep;110(3):281-90.
31. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Sr., Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of

Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Jul 1;63(25 Pt B):2935-59.

32. Arts EE, Popa C, Den Broeder AA, Semb AG, Toms T, Kitas GD, et al. Performance of four current risk algorithms in predicting cardiovascular events in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015 Apr;74(4):668-74.

33. Peters MJ, Symmons DP, McCarey D, Dijkmans BA, Nicola P, Kvien TK, et al. EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010 Feb;69(2):325-31.

34. Widdifield J, Bernatsky S, Paterson JM, Tomlinson G, Tu K, Kuriya B, et al. Trends in Excess Mortality Among Patients With Rheumatoid Arthritis in Ontario, Canada. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2015 Aug;67(8):1047-53.

35. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74.

36. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, du Berger R, et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001 Oct;44(10):2331-7.

37. Jung H, Bobba R, Su J, Shariati-Sarabi Z, Gladman DD, Urowitz M, et al. The protective effect of antimalarial drugs on thrombovascular events in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2010 Mar;62(3):863-8.

38. Aletaha D, Landewe R, Karonitsch T, Bathon J, Boers M, Bombardier C, et al. Reporting disease activity in clinical trials of patients with rheumatoid arthritis: EULAR/ACR collaborative recommendations. *Arthritis Rheum.* 2008 Oct 15;59(10):1371-7.

39. Arts EE, Fransen J, den Broeder AA, Popa CD, van Riel PL. The effect of disease duration and disease activity on the risk of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis.* 2015 Jun;74(6):998-1003.

40. Solomon DH, Greenberg J, Curtis JR, Liu M, Farkouh ME, Tsao P, et al. Derivation and internal validation of an expanded cardiovascular risk prediction score for rheumatoid arthritis: a Consortium of Rheumatology Researchers of North America Registry Study. *Arthritis Rheumatol.* 2015 May;67(8):1995-2003.

41. Arts EE, Popa CD, Den Broeder AA, Donders R, Sandoo A, Toms T, et al. Prediction of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: performance of original and adapted SCORE algorithms. *Ann Rheum Dis.* 2016 Apr;75(4):674-80.

42. Kzhyshkowska J, Gudima A, Moganti K, Gratchev A, Orekhov A. Perspectives for Monocyte/Macrophage-Based Diagnostics of Chronic Inflammation. *Transfus Med Hemother.* 2016 Mar;43(2):66-77.

43. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature.* 1997 Mar 20;386(6622):292-6.

44. Sousa S, Brion R, Lintunen M, Kronqvist P, Sandholm J, Mönkkönen J, et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Research.* 2015;17(1).

45. Laria A, Lurati A, Marrazza M, Mazzocchi D, Re KA, Scarpellini M. The macrophages in rheumatic diseases. *J Inflamm Res.* 2016;9:1-11.

46. Randolph GJ. Mechanisms That Regulate Macrophage Burden in Atherosclerosis. *Circulation Research.* 2014;114(11):1757-71.

47. Poteaux S, Gautier EL, Hutchison SB, van Rooijen N, Rader DJ, Thomas MJ, et al. Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of Apoe^{-/-} mice during disease regression. *J Clin Invest.* 2011 May;121(5):2025-36.

48. Tian F, Yu BL, Hu JR. mTOR mediates the cross-talk of macrophage polarization and autophagy in atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 2014 Nov 15;177(1):144-5.

49. Franca CN, Izar MCO, Hortencio MNS, do Amaral JB, Ferreira CES, Tuleta ID, et al. Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2017 Jun 1;131(12):1215-24.
50. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74-80.
51. Ziegler-Heitbrock L. Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. *Front Immunol*. 2015;6:423.
52. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep*. 2015 Sep 11;5:13886.
53. Wouters K, Gaens K, Bijnen M, Verboven K, Jocken J, Wetzels S, et al. Circulating classical monocytes are associated with CD11c+ macrophages in human visceral adipose tissue. *Sci Rep*. 2017 Feb 15;7:42665.
54. Graziano F, Vicenzi E, Poli G. Plastic restriction of HIV-1 replication in human macrophages derived from M1/M2 polarized monocytes. *J Leukoc Biol*. 2016 Nov;100(5):1147-53.
55. Hewing B, Au SC, Ludwig A, Ellerbroek R, van Dijk P, Hartmann L, et al. Severe Aortic Valve Stenosis in Adults is Associated with Increased Levels of Circulating Intermediate Monocytes. *J Cardiovasc Transl Res*. 2017 Feb;10(1):27-34.
56. Kunnathully V, Gomez-Lira M, Bassi G, Poli F, Zoratti E, La Verde V, et al. CD14(++) CD16(-) monocytes are the main source of 11beta-HSD type 1 after IL-4 stimulation. *Int Immunopharmacol*. 2017 Feb;43:156-63.
57. Ammirati E, Moroni F, Magnoni M, Di Terlizzi S, Villa C, Sizzano F, et al. Circulating CD14+ and CD14(high)CD16- classical monocytes are reduced in patients with signs of plaque neovascularization in the carotid artery. *Atherosclerosis*. 2016 Dec;255:171-8.
58. Wildgruber M, Czubba M, Aschenbrenner T, Wendorff H, Hapfelmeier A, Glinzer A, et al. Increased intermediate CD14(++)CD16(++) monocyte subset levels associate with restenosis after peripheral percutaneous transluminal angioplasty. *Atherosclerosis*. 2016 Oct;253:128-34.
59. Thomas GD, Hamers AAJ, Nakao C, Marcovecchio P, Taylor AM, McSkimming C, et al. Human Blood Monocyte Subsets: A New Gating Strategy Defined Using Cell Surface Markers Identified by Mass Cytometry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017 Aug;37(8):1548-58.
60. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 2018 Oct 16;49(4):595-613.
61. Fukui S, Iwamoto N, Takatani A, Igawa T, Shimizu T, Umeda M, et al. M1 and M2 Monocytes in Rheumatoid Arthritis: A Contribution of Imbalance of M1/M2 Monocytes to Osteoclastogenesis. *Front Immunol*. 2017;8:1958.
62. Williams H, Cassorla G, Pertsoulis N, Patel V, Vicaretti M, Marmash N, et al. Human classical monocytes display unbalanced M1/M2 phenotype with increased atherosclerotic risk and presence of disease. *Int Angiol*. 2017 Apr;36(2):145-55.
63. Jaipersad AS, Shantsila A, Lip GY, Shantsila E. Expression of monocyte subsets and angiogenic markers in relation to carotid plaque neovascularization in patients with pre-existing coronary artery disease and carotid stenosis. *Ann Med*. 2014 Nov;46(7):530-8.
64. Hou J, Zhang M, Ding Y, Wang X, Li T, Gao P, et al. Circulating CD14(+)CD163(+)CD206(+) M2 Monocytes Are Increased in Patients with Early Stage of Idiopathic Membranous Nephropathy. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:5270657.
65. Moroni F, Ammirati E, Norata GD, Magnoni M, Camici PG. The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neoangiogenesis, and Atherothrombosis. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:7434376.

66. Wang X, Chu Y, Wang W, Yuan W. mTORC signaling in hematopoiesis. *Int J Hematol*. 2016 Jan 20.
67. Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, et al. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation*. 2001 Oct 23;104(17):2007-11.
68. Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*. 2012 Jan;32(1):2-11.
69. Kurdi A, De Meyer GR, Martinet W. Potential therapeutic effects of mTOR inhibition in atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol*. 2015 Nov 9.
70. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*. 1999 Apr 27;99(16):2164-70.
71. Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation*. 2005 May 3;111(17):2257-73.
72. Panoulas VF, Mastoris I, Konstantinou K, Tsepili M, Ielasi A. Everolimus-eluting stent platforms in percutaneous coronary intervention: comparative effectiveness and outcomes. *Med Devices (Auckl)*. 2015;8:317-29.
73. Serruys PW, Ong AT, Piek JJ, Neumann FJ, van der Giessen WJ, Wiemer M, et al. A randomized comparison of a durable polymer Everolimus-eluting stent with a bare metal coronary stent: The SPIRIT first trial. *EuroIntervention*. 2005 May;1(1):58-65.
74. Serruys PW, Ormiston J, van Geuns RJ, de Bruyne B, Dudek D, Christiansen E, et al. A Poly lactide Bioresorbable Scaffold Eluting Everolimus for Treatment of Coronary Stenosis: 5-Year Follow-Up. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Feb 23;67(7):766-76.
75. Verheye S, Martinet W, Kockx MM, Knaapen MW, Salu K, Timmermans JP, et al. Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Feb 13;49(6):706-15.
76. Guo Y-y, Yao M, Wu S. Response to Feng Tian et al.: mTOR mediates the cross-talk of macrophage polarization and autophagy in atherosclerosis. *International Journal of Cardiology*. 2015;184:262.
77. Chen W, Ma T, Shen XN, Xia XF, Xu GD, Bai XL, et al. Macrophage-induced tumor angiogenesis is regulated by the TSC2-mTOR pathway. *Cancer Res*. 2012 Mar 15;72(6):1363-72.
78. Maiuri MC, Grassia G, Platt AM, Carnuccio R, Ialenti A, Maffia P. Macrophage Autophagy in Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013:1-14.
79. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):124-31.
80. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*. 2008;445:77-88.
81. Chen P, Cescon M, Bonaldo P. Autophagy-mediated regulation of macrophages and its applications for cancer. *Autophagy*. 2013;10(2):192-200.
82. Chang CP, Su YC, Hu CW, Lei HY. TLR2-dependent selective autophagy regulates NF-kappaB lysosomal degradation in hepatoma-derived M2 macrophage differentiation. *Cell Death Differ*. 2013 Mar;20(3):515-23.
83. Chang CP, Su YC, Lee PH, Lei HY. Targeting NFkB by autophagy to polarize hepatoma-associated macrophage differentiation. *Autophagy*. 2013 Apr;9(4):619-21.
84. Rana AK, Li Y, Dang Q, Yang F. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *Int Immunopharmacol*. 2018 Dec;65:348-59.

85. Leers MPG, Stockem C, Ackermans D, Loeffen R, Ten Cate H, Kragten JA, et al. Intermediate and nonclassical monocytes show heterogeneity in patients with different types of acute coronary syndrome. *Cytometry A*. 2017 Nov;91(11):1059-67.
86. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176460.
87. Kim YM, Park JM, Grunwald D, Kim DH. An expanded role for mTORC1 in autophagy. *Mol Cell Oncol*. 2016 Jan;3(1):e1010958.
88. Mizushima N, Yoshimori T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*. 2014;3(6):542-5.
89. Dessein P, Christian B, Woodiwiss AJ, Norton G, Solomon A. Public healthcare attendance associates with enhanced conventional and non-conventional atherosclerotic cardiovascular disease risk burdens in established rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2010 Mar-Apr;28(2):230-7.
90. Vazquez-Del Mercado M, Nunez-Atahualpa L, Figueroa-Sanchez M, Gomez-Banuelos E, Rocha-Munoz AD, Martin-Marquez BT, et al. Serum levels of anticyclic citrullinated peptide antibodies, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and C-reactive protein are associated with increased carotid intima-media thickness: a cross-sectional analysis of a cohort of rheumatoid arthritis patients without cardiovascular risk factors. *Biomed Res Int*. 2015;2015:342649.

9. Materiales y Métodos

Tipo de estudio

Transversal, caso-control.

Descripción de la población en estudio

Pacientes de 18 a 65 años con diagnóstico de AR de acuerdo a criterios de clasificación EULAR/ACR 2010, que asisten a Policlínico de Reumatología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Tamaño de muestra

Para la estimación del tamaño de muestra necesario, se utilizó un error alfa de 0,05 y un poder de 80%. El cálculo se realizó considerando comparación de medias de grupos independientes con varianzas desiguales. Se realizó análisis de tamaño muestral para todas las mediciones incluidas en el presente trabajo. Se decidió utilizar como referencia, los valores de LC3b y BECLIN1 (mediciones de autofagia) determinados en el estudio de Chang et al. 2013, al ser los con diferencia más pequeña. En este, pacientes con ateromatosis tenían valores de 1,62 veces más altos que aquellos sin ateromatosis.

El tamaño de muestra necesario fue 18 (9 sujetos de estudio por grupo).

Criterios de inclusión y exclusión de pacientes con AR

- Inclusión:
 - Hombres y mujeres con AR diagnosticada que cumplen criterios EULAR/ACR 2010.
 - Pacientes con y sin eventos cardiovasculares previos (infarto con y sin supradesnivel del ST, accidente cerebrovascular isquémico, enfermedad arterial oclusiva de extremidades inferiores sintomática)
 - Paciente capaz de otorgar consentimiento y que firma formulario de consentimiento informado.

- Exclusión:
 - Insuficiencia cardíaca
 - Otras enfermedades autoinmunes diagnosticadas (Excepto Síndrome de Sjögren)
 - Diabetes mellitus 2
 - Hombres y Mujeres mayores de 65 años

Fuente y método de recolección de datos

Se construyó una base de datos a partir de los registros de la ficha clínica y de entrevistas a los pacientes

Base de datos y métodos estadísticos

Se construyó una base de datos generada a partir de registro de datos en el programa Excel usando como código el orden de ingreso al estudio, para eliminar datos identificadores. La base de datos final será exportada a STATA para su análisis.

Análisis estadístico

En primer lugar, se realizó un análisis exploratorio de los datos identificando la distribución de las variables, valores *outlayers* y valores faltantes. En el caso de valores *outlayers*, se evaluó si existió un problema en la digitación de los datos y la plausibilidad biológica de dichos valores. Respecto a los valores faltantes, inicialmente, se intentó recuperar el dato a partir de la ficha del paciente o contactándolo directamente, cuando no fue posible recuperar los datos, se evaluó la característica de la pérdida, de manera de identificar la introducción de un posible sesgo de selección. Se excluyó del estudio estos datos.

Posteriormente, se realizó la descripción de las variables. Para variables cuantitativas continuas y discretas, de acuerdo con su distribución, se eligieron las medidas de tendencia central (promedio, mediana o moda) y dispersión (desviación estándar o recorrido intercuartílico) o posición (ej. Percentil 25, 75) a utilizar. Las variables categóricas, se describieron mediante frecuencias absolutas y relativas.

La selección de la prueba para comparar variables cuantitativas se realizó dependiendo de la distribución de los datos, eligiendo test paramétricos si la distribución es normal y no paramétrico si no lo es o no se cumplen los supuestos necesarios. Los análisis estadísticos serán realizados en STATA 13.1 y Graphpad Prism 6. Se definió como estadísticamente significativo la obtención de un valor p menor o igual a 0,05.

Implicancias éticas

- Diseño del estudio: Este es un estudio caso-control, en que la única intervención adicional para los participantes es la toma de muestra de sangre periférica. El tratamiento del paciente es una decisión del médico tratante, de manera independiente al estudio.
- Justicia Individual y Grupal: Participación equitativa de todos los sujetos, por lo que repartimos la carga de participar en la investigación, logrando así el principio de justicia individual.

Mediante la inclusión de la mayoría de los pacientes con AR, permitimos el acceso a una población lo más amplia posible a la investigación, con lo que cumplimos el principio de justicia grupal

- Autonomía: En este estudio se respeta el principio de autonomía, ya que todos los pacientes participarán del proceso de consentimiento informado, que finalizará en la documentación de éste, permitiendo el uso de las ecografías carotídeas y sus muestras de sangre para el estudio.
- Respeto a la confidencialidad: La información sensible será tratada con la máxima confidencialidad, usando bases de datos seguras y anonimizando la información mediante el uso de un identificador en vez del nombre,
- No maleficencia: Tanto la toma de ecografía como la toma de muestra de sangre presentan un riesgo no mayor que el encontrado en la vida diaria o durante la realización de exámenes de rutina, por lo tanto, el estudio implicará un riesgo mínimo para los participantes.
- Beneficencia: La obtención de resultados de este estudio supone un beneficio potencial para los participantes y los pacientes con AR en general, permitiendo obtener información respecto de las causas del aumento de riesgo cardiovascular en pacientes con AR, lo que podría seguirse de cambios en la terapia de la enfermedad con miras a

controlar este riesgo. La minimización del riesgo y la posibilidad de beneficio para los participantes en la investigación permite la consecución del principio de beneficencia.

Consentimiento Informado

Todos los pacientes fueron reclutados luego de una sesión informativa de consentimiento informado, posterior a lo cual se firmó un formulario de consentimiento informado para participar en el estudio que incluye el uso de la información contenida en la ficha clínica y la toma de muestra de sangre. En la autorización para toma de muestra de sangre y en la sesión de consentimiento se informará a los participantes que tienen derecho a hacer todas las preguntas que consideren necesarias respecto del protocolo de investigación en el momento que deseen y que pueden retirarse cuando quieran del protocolo sin sufrir ninguna consecuencia por ello. No habrá ningún tipo de compensación directa por participar en el estudio, ni penalizaciones por abandonarlo.

Los resultados individuales del estudio serán reportados a cada paciente, en caso de que este lo desee.

Los resultados generales del estudio serán comunicados a la totalidad de los participantes que acuerden ser informados, lo cual también se hará a la comunidad científica, mediante medios a determinar.

Selección de pacientes

Al estudio ingresaron pacientes con AR que cumplieron con criterios de inclusión y sin criterios de exclusión. Los datos fueron extraídos de la entrevista clínica del paciente con el médico reumatólogo y la ficha clínica.

Criterios de pareamiento

Los criterios de pareamiento fueron seleccionados de los descritos en la literatura (16, 24, 26, 31, 89, 90) y/o por, en el caso de uso de corticoides, por efectos impredecibles sobre vías ubicuas y con efectos pleiotrópicos.

Pareamiento por factores clásicos:

- Edad: \pm 5 años
- Sexo: Igual Sexo
- Presión arterial sistólica: Mayor o menor de 140 mmHg
- Colesterol HDL: Normal o alterado
- Tabaquismo: Índice paquetes año \pm 10

Pareamiento por factores de AR:

- Tiempo de diagnóstico de AR: \pm 1 año
- Número de DMARDS: 2 o menos y mayor de 2
- Uso de corticoides sistémicos: Los pacientes que los usen al momento del estudio serán pareados, los pacientes con corticoides suspendidos serán pareados según el tiempo de suspensión con intervalos de \pm 3 meses.
- DAS 28: $< 2,6 / 2,6 - 3,2 / 3,2 - 5,1 / > 5,1$

Toma de muestra de sangre periférica

Se obtuvo muestra de sangre periférica a los pacientes AR con eventos cardiovasculares y sus controles pareados sin eventos al momento del ingreso al estudio. En la toma de muestra, se extrajo sangre en 6 tubos: 1 tubo Tapa lila con EDTA (4 ml) para Hemograma+VHS, 4 tubo Tapa verde con Heparina (10 ml) para Proteína C reactiva, Perfil Lipídico y extracción de PBMC y 1 Tubo tapa roja sin anticoagulante (10 ml) para RT-PCR.

Se midió:

- Hemograma + VHS
- Proteína C Reactiva
- Perfil Lipídico
- LC3b, Beclin1 (Actividad autofagia)

Se extrajo mononucleares de sangre periférica para:

- Citometría intracelular para S6Rp
- Citometría flujo CD14, CD16, CD19, CD3, CD66b, CD163, CCR2, HLA-DR, sonda de viabilidad.

Protocolos Experimentales

1.- Enzima inmunoensayo (ELISA) LC3B y Beclin1 de plasma

Primero se preparará la curva estándar en duplicado o triplicado, para lo cual se preparará la solución estándar a concentración de 500 pg/mL con 1X Diluyente de ELISA/ELISPOT. Se agregará 100 µL del Diluyente de ELISA/ELISPOT a los pocillos de concentración menor a 500 pg/mL. Luego se añadirán 200 µL de la solución de 500 pg/mL a los pocillos de concentración de 500 pg/mL (A1 y A2). Posteriormente se removerán 100 µL de estos pocillos y se depositarán en los pocillos adyacentes. Luego se pipetearán de tal forma de homogeneizar la solución y esos pocillos quedarán a una concentración de 250 pg/mL (B1 y B2). Se removerán 100 µL de B1 y B2 para transferir a los pocillos C1 y C2, los que se pipetearán para homogeneizar la solución a una concentración de 125 pg/mL. Luego, se tomarán 100 µL de C1 y C2 y se depositarán en D1 y D2, los que se pipetearán para homogeneizar la solución a una concentración de 62,5 pg/mL. Lo anterior se repetirá con los pocillos E1, E2, F1, F2, G1, G2, H1, H2 para llegar a una concentración de 4 pg/ml. Al transferir la solución a pocillos H1 y H2 se eliminarán 100 µL de la solución homogeneizada para que todos los pocillos contengan un volumen de 100 µL. Se incluirán 2 pocillos blancos (A3 y A4) que contendrán 100 µL de 1X Diluyente de ELISA/ELISPOT. Posteriormente, se construirá la curva estándar mediante un análisis de regresión.

Luego, se realizará la medición de las muestras: Se diluirá el anticuerpo de captura usando Buffer de Cobertura a concentración de entre 1 y 4 pg/mL según el clon en uso. Se cubrirá el pocillo con 100 µL por pocillo con anticuerpo de captura. Se sellará la placa y se incubará a 4°C durante la noche. Luego, se aspirará el contenido de los pocillos y se lavará 3 veces con al menos 300 µL de Buffer de Lavado por pocillo, luego se invertirá la placa y se secará con papel absorbente. Se diluirá el Diluyente de ELISA/ELISPOT 5X para concentración de trabajo de 1X usando agua DI. Se bloquearán los pocillos con 200 µL por pocillo del 1X Diluyente de ELISA/ELISPOT. Se incubará a temperatura ambiente por 1 hora. Se aspirará el contenido de los pocillos y se lavarán 3 veces con al menos 300 µL de Buffer de Lavado por pocillo. Se invertirá el pocillo y se secará con papel absorbente para secar. Se realizará la curva estándar como se explicó previamente y se añadirán 100 µL de muestras a los pocillos previamente designados. Se incubará a 4°C durante toda la noche. Luego, se aspirarán los pocillos y se lavarán 5 veces con al menos 300 µL de Buffer de Lavado por pocillo. Se invertirá el pocillo y se secará con papel absorbente. Se diluirá el anticuerpo de detección biotinilado usando 1X Diluyente de ELISA/ELISPOT (concentración de 0,5 a 2pg/mL según el clon) y se añadirán

100 μ L a cada pocillo. Se sellará la placa y se incubará a temperatura ambiente por 1 hora. Se aspirará y lavará 5 veces con al menos 300 μ L de Buffer de Lavado por pocillo, se invertirá la placa y secará con papel absorbente. Se diluirá la Avidina-HRP 1:500 usando 1X Diluyente de ELISA/ELISPOT y se añadirán 100 μ L de esta solución por pocillo. Se sellará la placa e incubará a temperatura ambiente por 30 minutos. Se aspirará el contenido y se lavará 7 veces con al menos 300 μ L de Buffer de lavado por pocillo. Se invertirá la placa y secará con papel absorbente, luego se dejará el buffer de lavado por 1-2 minutos antes de aspirarlo. Posteriormente, se añadirán 100 μ L de SuperAqua Blue o TMB a cada pocillo y se incubará a temperatura ambiente por 15 minutos. La reacción de color puede ser detenida con 100 μ L de Solución Stop y leída a 405 nm (SuperAqua Blue) o 450 nm (TMB) en equipo Sunrise (Tecan Trading AG, Suiza). Las muestras de suero de pacientes con AR con eventos cardiovasculares previos y sus controles pareados, serán centrifugadas a 2500 g por 10 minutos a 4°C y guardadas a -20°C hasta el momento de uso. Beclin1 y LC3 se medirán usando kit comercial específico (SunLong Biotech Co., LTD, China).

- Microtubule associated protein 1 Light chain 3 beta. BD Pharmigen, California, EUA
- Beclin1 ELISA Kit. BD Pharmigen, California, EUA

2.- Separación de mononucleares (PBMC) de sangre periférica por gradiente de Ficoll

Se realizará separación de mononucleares de sangre periférica para medición de mTORC y perfil fenotípico de monocitos de pacientes con AR con eventos cardiovasculares previos y sus controles pareados.

En campana de flujo laminar, las muestras de sangre serán diluidas a 1:1 con PBS 1X en tubo cónico de 50 ml. Se colocará la sangre diluida cuidadosamente sobre el Ficoll, se centrifugará por 20 minutos a 400xg con el freno apagado, se recolectarán las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) localizado en la interfase del PBS y el Ficoll y se depositará en un nuevo tubo, en el cual se agregará PBS para lavar las células. Se centrifugará la suspensión de células por 5 minutos a 300 ó 400xg a 4°C. Se eliminará el sobrenadante. Luego se resuspenderá el pellet en RPMI suplementado con suero fetal bovino 10% y se retirará una alícuota de 10 μ L de suspensión, la que se mezclará con 10 μ L de Tripán Blue para realizar un conteo celular y análisis de viabilidad mediante proporciones aritméticas. Se centrifugará la

suspensión de células nuevamente por 4 ó 5 minutos a 300 ó 400xg a 4°C y posteriormente se resuspenderá en cantidad suficiente para lograr una concentración final de 1×10^7 células/ml.

3.- Medición de actividad mTORC en monocitos de sangre periférica

En PBMC de casos y controles se evaluó actividad de mTORC por citometría de flujo usando el citómetro FACSverse y FACS LSR-fortessa y su análisis se realizará mediante el programa FlowJo 10.7.

Se usaron los siguientes reactivos:

- Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) Antibody. Cell Signaling Technology. Danvers, EUA

4.- Citometría flujo en monocitos circulantes

La caracterización fenotípica de las poblaciones de monocitos se realizó mediante citometría de flujo, usando el citómetro FACSverse y FACS LSR-fortessa y su análisis se realizó mediante el programa FlowJo 10.7.

Se usó los siguientes reactivos:

- anti-CD86 Clone 2331 (FUN-1) BD Pharmigen, California, EUA.
- anti-CD163 BD Pharmigen, California, EUA
- anti-CD14 Biolegend, California, EUA.
- anti-CD16, Biolegend, California, EUA.
- anti-CCR2, Biolegend, California, EUA.
- anti-CD68 (HLA-DR), Biolegend, California, EUA.
- anti-IL1 β , Biolegend, California, EUA.
- anti-IL6, Biolegend, California, EUA.
- anti-S6Rp, Biolegend, California, EUA.
- anti-CD66b, Biolegend, California, EUA.
- anti-CD3, Biolegend, California, EUA.
- anti-CD19, Biolegend, California, EUA.