



MCP4 COMO BIOMARCADOR DE DIAGNÓSTICO EN ESCLEROSIS SISTEMICA

ESTUDIANTE:

JUANA CAMILA MAYORGA JIMENEZ

ASESORES:

CAROLINA RAMIREZ SANTANA

CLAUDIA CRUZ BAQUERO

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

TRABAJO DE GRADO

BOGOTA, 2024

DEDICATORIA

Ha sido un largo camino lleno de altos y bajos, me queda agradecer a Dios por permitirme culminar una etapa con muchos aprendizajes y objetivos logrados.

A mi padre, mi héroe a lo largo de la vida. Gracias por tu apoyo incondicional, por tus palabras de aliento en los momentos difíciles y por ser mi ejemplo de perseverancia y sabiduría. Este trabajo es también tuyo, porque cada paso que he dado ha sido posible gracias a tu amor transparente y constante.

A mi madre, mi fuente de amor puro. Tu valentía y fuerza han iluminado mi camino. Este trabajo de grado es un tributo a tu amor infinito, que me ha dado las alas para volar y perseguir mis sueños.

A mi hermano, mi compañero de mil momentos. Entre risas y lágrimas, hemos caminado juntos, enfrentando obstáculos y celebrando logros. Gracias por tu apoyo incondicional y por ser mi faro en los momentos de oscuridad. Este trabajo lleva también tu nombre, como símbolo de nuestra unión.

A mi pareja, Felipe, mi cómplice. Tu amor y comprensión han sido mi refugio en los días grises y mi alegría en los días soleados. Este trabajo es nuestro, porque cada paso que he dado, lo he dado contigo a mi lado, compartiendo sueños y construyendo un camino día tras día.

Gracias por ser mi sostén, mi inspiración y mi mayor tesoro en esta travesía, nada hubiera sido posible sin ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, mi alma mater, por brindarme la oportunidad de formarme académicamente, de la mano de excelentes maestros, siendo parte fundamental de mi desarrollo profesional, principalmente, a la docente Claudia Andrea Cruz por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad del Rosario, en especial al Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes CREA, a la Dra. Carolina Ramírez Santana por su confianza depositada y conocimiento brindado para la elaboración del trabajo de grado, a la Dra. Yeny Ampudia y la Dra. Diana Monsalve, por su invaluable guía y conocimientos que fueron fundamentales para culminar las prácticas y el presente proyecto.

A Sandra Salas, por su sabiduría transmitida y por ser un soporte a lo largo de este trabajo, tu amabilidad y generosidad son un tesoro que guardaré por siempre en mi corazón.

A Gabriel Rojas y Benjamín Calderón, por hacer de nuestras prácticas especializadas en CREA un período enriquecedor y agradable. Su profesionalismo y calidez humana hicieron de cada día una experiencia única.

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	7
INDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
1. ANTECEDENTES	13
2. MARCO REFERENCIAL.....	16
2.1 Esclerosis sistémica (ES)	16
2.2 Epidemiología	17
2.3 Manifestaciones clínicas	18
2.3.1 Afectación microvascular	18
2.4 Fisiopatología de la esclerosis sistémica.....	22
2.5 Factores ambientales, genéticos y epigénéticos	23
2.6 Vasculopatía.....	24
2.7 Respuesta inmune.....	25
2.7.1 Inmunidad innata	25
2.7.2 Inmunidad adaptativa	27
2.8 Citoquinas implicadas en la Esclerosis Sistémica.....	29
2.9 Fibrosis.....	30
2.9.1 Pericitos y células musculares lisas	31
2.9.2 Fibroblastos	31
2.10 Criterios de clasificación.....	32
2.11 Evaluación de autoanticuerpos.....	34
2.12 Tratamiento	35
2.13 Biomarcadores.....	37
2.13.1 Biomarcadores séricos propuestos para Esclerosis Sistémica.....	37
2.14 Proteínas quimioatrayentes MCP Y MCP-4/CCL13	39
2.14.1 Estructura proteica de MCP4.....	40
2.14.2 MCP4 en el proceso de inflamación.....	41
2.14.3 MCP4 y enfermedades autoinmunes	41
2.14.4 MCP4 y ES	42
3. DISEÑO METODOLOGICO.....	43

3.1 Universo, población y muestras	43
3.2 Hipótesis, variables e indicadores	44
3.2.1 Hipótesis	44
3.2.2 Variables	45
3.2.3 Indicadores.....	45
3.3 Objetivos	45
3.4 Técnicas y procedimientos	46
3.4.1 Obtención de las muestras	46
3.4.2 Evaluación de la proteína MCP4 en suero.....	46
3.4.3 Análisis Estadístico.....	47
4. RESULTADOS	48
4.1 Estado sociodemográfico de pacientes con Esclerosis Sistémica.....	48
4.2 Estado clínico de pacientes con Esclerosis Sistémica.....	49
4.2.1 Comorbilidades.....	49
4.2.2 Poliautoinmunidad.....	50
4.2.3 Criterios ACR/EULAR 2013.....	51
4.2.4 Tipo de Esclerosis Sistémica según su extensión cutánea.....	52
4.3 Identificación de la proteína MCP4 en pacientes con Esclerosis Sistémica	53
4.3.1 Curva ROC y umbral de detección de la proteína MCP4.....	53
4.3.2 Prueba Mann Whitney	55
4.4 Rol de la proteína MCP4 en la Esclerosis Sistémica	56
4.4.1 Características sociodemográficas.....	56
4.4.2 Comorbilidades asociadas, poliautoinmunidad y tratamiento.....	57
5. DISCUSIÓN	60
6. CONCLUSIONES	63
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proteínas séricas expresadas diferencialmente entre pacientes con Esclerosis Sistémica y controles sanos.	15
Figura 2. Fases en Fenómeno de Raynaud.....	19
Figura 3. Afectación cutánea en la Esclerosis Sistémica.	20
Figura 4. Triada fisiopatológica en Esclerosis Sistémica.	23
Figura 5. Fisiopatología de la Esclerosis Sistémica y sus mecanismos.	32
Figura 6. Descripción general de las células que liberan MCP4 a nivel de proteína y la expresión de cinco receptores para esta proteína en las células.....	40
Figura 7. Estructura de MCP4	41
Figura 8. Representación gráfica de universo, población y muestra del estudio.	43
Figura 9. Representación esquemática de Elisa tipo Sandwich para detectar MCP4.....	47
Figura 10. Comorbilidades estudiadas en pacientes con Esclerosis Sistémica en estudio.	50
Figura 11. Poliautoinmunidad en pacientes con Esclerosis Sistémica en estudio.	51
Figura 12. Clasificación de Esclerosis Sistémica según la extensión cutánea de los pacientes en estudio.	52
Figura 13. Curva ROC del ensayo.	53
Figura 14. Gráfica de concentraciones de MCP-4 en el grupo de Esclerosis sistémica e individuos sanos.....	55
Figura 15. Comorbilidades presentadas en pacientes que expresan MCP4.....	57
Figura 16. Gráfica tratamiento en pacientes que expresan MCP4	58
Figura 17. Concentración MCP4 y poliautoinmunidad.	58
Figura 18. Rol de MCP4 en la Esclerosis Sistémica.....	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias en formas clínicas de la enfermedad. 16

Tabla 2. Afectación orgánica en Esclerosis Sistémica..... 21

Tabla 3. Citoquinas implicadas en la Esclerosis Sistémica. 30

Tabla 4. Criterios de clasificación EULAR 2013. 33

Tabla 5. Autoanticuerpos y su asociación en Esclerosis Sistémica. 34

Tabla 6. Tratamiento recomendado para Esclerosis Sistémica..... 35

Tabla 7. Tipos de biomarcadores. 37

Tabla 8. Biomarcadores séricos propuestos para Esclerosis Sistémica. 38

Tabla 9. Estado sociodemográfico de pacientes con Esclerosis Sistémica..... 49

Tabla 10. Presentación de criterios de EULAR/ACR 2013 en pacientes. 51

Tabla 11. Tabla de análisis umbral de detección de la proteína MCP4..... 54

Tabla 12. Valores prueba Mann Whitney 55

Tabla 13. Características sociodemográficas de pacientes que expresan MCP4..... 56

Tabla 14. Criterios ACR/EULAR en pacientes que expresan MCP4..... 59



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA.

RESUMEN

MCP4 COMO BIOMARCADOR DE DIAGNOSTICO EN ESCLEROSIS SISTEMICA

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo evaluar la proteína MCP4 como biomarcador candidato para el diagnóstico de la Esclerosis Sistémica, una enfermedad autoinmune que implica vasculopatía, respuesta inmune desregulada y fibrosis. Esta enfermedad se presenta frecuentemente en las mujeres, en una edad promedio de 45 años. A pesar de tener una prevalencia baja, su mortalidad es alta y ha sido clasificada en Colombia como una enfermedad huérfana, debido a su heterogeneidad en su presentación clínica es de difícil tratamiento y diagnóstico. La detección temprana de esta enfermedad es fundamental para un manejo clínico efectivo, es por ello que investigadores están en busca de un biomarcador que permita un diagnóstico temprano, mejorando la calidad de vida del paciente. Se propone la proteína MCP4 como biomarcador de diagnóstico para Esclerosis Sistémica basado en su implicación en la fisiopatología de la enfermedad. Para su estudio, se llevará a cabo la recolección de muestras de suero sanguíneo de pacientes diagnosticados con Esclerosis

Sistémica y un grupo de individuos sanos como controles. Se analizarán los niveles séricos de la proteína MCP4 y se evaluará su correlación con parámetros clínicos pertinentes. Los resultados de esta investigación pretenden contribuir al diagnóstico temprano de la esclerosis sistémica y a una comprensión de la fisiopatología de este trastorno.

PALABRAS CLAVES: Autoinmunidad, esclerosis Sistémica, respuesta inmune, proteína, biomarcador, concentración, fisiopatología, diagnostico.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico tiene como función proteger al organismo contra agentes externos potencialmente dañinos que pueden comprometer la integridad del mismo. Las células que participan en la respuesta inmune, adquieren la capacidad a lo largo de su desarrollo a distinguir entre antígenos propios y ajenos (1). Sin embargo, el sistema inmune puede perder la tolerancia de distinguir lo propio, desencadenando autoinmunidad. Este proceso implica que el sistema inmune reaccione contra autoantígenos induciendo daño a diversas células, tejidos y órganos, desarrollando enfermedades autoinmunes (EAIs).

Las EAIs cursan con cronicidad, son progresivas y se perpetúan a lo largo del tiempo (2). Estas enfermedades pueden ser sistémicas u órgano-específicas y varía según la ubicación del antígeno diana (3) . Las EAIs son poco comunes, pero sus efectos sobre la mortalidad y la morbilidad son significativos. Los trastornos más frecuentes en la población son: Artritis Reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren (SS) y esclerosis sistémica (ES) (4). Estas enfermedades generan un impacto en la calidad de vida de los individuos que lo padecen, generando incrementos en los costos de la atención en salud (5).

Una de las enfermedades que genera mayor impacto en la calidad de vida de los pacientes es la ES (6) una EAI del tejido conectivo caracterizada por la presencia de vasculopatía, desregulación de la respuesta inmune, fibrosis en piel y órganos (7) . La excesiva acumulación de colágeno y otras sustancias en la matriz extracelular de órganos como pulmón, hígado, corazón y riñón, resulta en disfunción orgánica y, finalmente, en la muerte del paciente. Aunque aún se desconoce su etiología, distintos factores genéticos y ambientales pueden estar involucrados en el desarrollo de la enfermedad (8).

En la actualidad, no existen criterios de diagnóstico establecidos para ES, sin embargo, la American College of Rheumatology (ACR)/European League against Rheumatism (EULAR) estableció los criterios de clasificación de la enfermedad como los hallazgos en piel, y la presencia de autoanticuerpos, los cuales no solo sirven como una herramienta de diagnóstico, sino que también tienen un valor pronóstico y de predicción del fenotipo y la evolución de la enfermedad. Esto teniendo en cuenta que la ES muy temprana puede caracterizarse por los criterios de diagnóstico muy temprano de esclerosis sistémica (VEDOSS), que incluyen una combinación variable de fenómeno de Raynaud (RP), dedos hinchados, capilaroscopia anormal del pliegue ungueal (NFC) y anticuerpos antinucleares (ANA)/específicos de ES. Si bien estos pacientes con VEDOSS podrían representar etapas tempranas de ES que progresan a ES definida clínicamente establecida, también podrían representar una forma muy leve de ES que no progresará a ES definitiva. Actualmente carecemos de criterios validados para diferenciar a los pacientes con ES muy temprana y potencialmente progresiva de los pacientes con ES muy leve y no progresiva. Esta es una limitación importante para la práctica clínica, ya que los pacientes muy leves necesitan un seguimiento, una estratificación del riesgo y una estrategia de tratamiento muy diferentes a los de los pacientes potencialmente progresivos. El tiempo para considerar una ES temprana y tardía es utilizando un valor de corte de <5 y ≥ 5 años de duración de la enfermedad (121).

Los autoanticuerpos incluidos dentro de los criterios de ARC/EULAR son anticuerpos anticentrómero (ACA), anticuerpos anti-topoisomerasa I (Scl-70 o ATA) y anticuerpos anti-ARN polimerasa III (ARA). A pesar de que estos autoanticuerpos son considerados los únicos biomarcadores biológicos establecidos en los criterios de clasificación de ES, lamentablemente presentan una prevalencia variable con baja especificidad y sensibilidad (9). Por tal motivo el diagnóstico de ES, se fundamenta en la identificación de las manifestaciones fibróticas en piel y órganos internos, las cuales aparecen en las fases tardías de la enfermedad, conduciendo a un retraso en el tratamiento oportuno en estos pacientes. Por lo tanto, se hace necesario comprender la fisiopatología de estas enfermedades e identificar los componentes involucrados, como células inmunes, proteínas, citoquinas, receptores, vías de señalización que puedan ser utilizados para entender la fisiopatología de la enfermedad, establecer un diagnóstico temprano y un tratamiento oportuno para pacientes con ES (10). Es por ello que se ha planteado la importancia de los biomarcadores como indicadores que miden la respuesta a una interacción biológica, que ocurre a nivel celular o molecular y además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad (11).

Esta enfermedad tiene impacto en la disminución de la calidad de vida de los pacientes y en la mortalidad (12). La enfermedad afecta con más frecuencia al sexo femenino en una proporción de 3-5:1, en la cuarta y quinta década de la vida (13). Su incidencia y prevalencia presenta una alta variabilidad según la raza y la distribución geográfica (14), siendo más frecuente en el continente americano que en el europeo. En Estados Unidos, se ha descrito una incidencia de 19 casos/1.000.000 de habitantes y una prevalencia global de 240 casos/1.000.000; mientras que en Europa se ha estimado que su incidencia es de 4-5 casos/1.000.000 de habitantes y su prevalencia de 30-126 casos/1.000.000 (7).

A nivel global se han identificado entre 6,000 y 7,000 enfermedades huérfanas (15). En Colombia se han identificado alrededor de 1.920 enfermedades, donde se ha descrito que la ES ha sido incluida dentro de las “enfermedades huérfanas” establecidas por el Ministerio de Salud y Protección Social en Colombia en la resolución 023 de 2023 (16,17), motivando a la comunidad científica y clínica en avanzar y proponer estrategias de diagnóstico y tratamiento para la ES.

Por consiguiente, investigadores han propuesto potenciales biomarcadores que puedan conducir a un diagnóstico temprano de ES, como marcadores genéticos, proteómicos y metabólicos que cumplan un papel importante en la ES. Algunos ejemplos de ellos son citoquinas como, IL-2, TNF- α (18), y algunas proteínas como CCL18 (19), CX3CL1 (20) y CXCL9 (21) relacionándose con el mecanismo fisiopatológico de la ES.

Una de las proteínas que se ha visto relacionada con la fisiopatología de ES es la quimioquina MCP4 la cual tiene como función establecer la migración celular, la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de citoquinas proinflamatorias en células epiteliales, endoteliales y musculares. A nivel de proteína, se ha informado que esta quimioquina está presente en condrocitos de rodilla asociados a AR, células epiteliales del túbulo renal proximal humano (22), y ha sido estudiada en el progreso de diferentes patologías asociadas a los pulmones con relación a infiltración de células como lo es el asma, EPOC, neumonía (23), también, se ha investigado su relación con EAIs, como la AR (24) en la cual el aumento está asociado con un diagnóstico desfavorable de la enfermedad. En este sentido la proteína MCP4 como objetivo de estudio puede apoyar investigaciones futuras sobre la ES para su diagnóstico.

1. ANTECEDENTES

La ES es una EAI del tejido conectivo de etiología desconocida, la cual induce fibrosis en piel y en diferentes órganos. Este proceso está dado por alteraciones en la microcirculación, con

una desregulación de la respuesta inmune que conlleva a la progresión de fibrosis generando daños en los órganos afectados(25) . Esta enfermedad se da con poca frecuencia, estimándola en comparación con enfermedades como LES y AR (26) La edad media en la que se diagnostica la patología es en los 45 años y se encuentra una importante prevalencia en el sexo femenino. Se ha planteado que diferentes factores puedan estar involucrados en el desarrollo de la enfermedad como factores genéticos asociados a HLA y no HLA (27), y factores ambientales como la exposición a sílice, metales pesados, cloruro de vinilo, pesticidas, tintes de pelo, humos industriales (28,29).

El grupo de investigación del Centro de Estudio de Enfermedades autoinmunes, CREA de la Universidad del Rosario ha venido trabajando en la identificación de nuevos biomarcadores de diagnóstico en EAIs. En un estudio piloto realizado en el grupo, se identificaron 7 proteínas a partir de una cohorte de pacientes con ES limitada (n=7), todas mujeres, teniendo en cuenta su edad, edad de inicio de la enfermedad y duración de esta, incluyendo en ellas la mediana y el intervalo intercuartílico (IIQ).

- Edad: Mediana 54 (IIQ) (IIQ 42-62)
- Edad de inicio: Mediana 46 (IIQ 20-59)
- Duración de la enfermedad: Mediana 4 (IIQ 3-38)

Ninguna de las pacientes tenía poliautoinmunidad o autoinmunidad familiar. Esto realizado por medio de la herramienta de ensayo de extensión de proximidad (PEA) de Olink Proteomics (30), en el cual se encontraron proteínas sobre expresadas en pacientes con ES en comparación con controles sanos, estos datos fueron representados en un Volcano plot (Figura 1).

Figura 1. Proteínas séricas expresadas diferencialmente entre pacientes con Esclerosis Sistémica y controles sanos.



Nota. Creación propia, CREA.

Para este proyecto, se evaluó la proteína, también conocida como Proteína Químico Atractora de Monocitos-4. Esta proteína desempeña un papel crucial en la migración de monocitos, macrófagos, linfocitos T y eosinófilos a través de sus ligandos funcionales. Se ha observado una correlación significativa entre esta proteína y su aumento en pacientes que padecen AR. Los niveles séricos de MCP4 y su expresión en los tejidos cartilagosos han mostrado un incremento notable en estos pacientes. La articulación se ha determinado como el principal foco de inflamación en la AR, y se ha identificado que los fibroblastos y condrocitos sinoviales son las células responsables de la producción de MCP4 en esta área. (22,24). Igualmente, ha sido identificada en SS donde los anticuerpos asociados pueden regular positivamente la expresión de quimioquinas CC (CCL2, CCL13 y CCL20) en las células epiteliales de las glándulas salivales humanas, además, se publicó un estudio con asociación a la ES dónde se determinaron los niveles séricos de pacientes sanos y pacientes con ES, LES, dermatomiositis y dermatitis atópica, encontrando un aumento significativo en quienes cursan con ES. Los

resultados revelaron un incremento significativo en los pacientes con ES, lo que sugiere que MCP4 podría ser considerado como un biomarcador prometedor para la ES (31).

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Esclerosis sistémica (ES)

La ES es una enfermedad reumática de tipo autoinmune del tejido conectivo que causa inflamación en la piel y otras áreas del cuerpo. Esta inflamación conlleva cambios degenerativos y fibrosis lo cual origina parches de piel dura y gruesa. Una enfermedad del tejido conectivo es aquella que afecta tejidos como la piel, los tendones y los cartílagos, es una enfermedad muy heterogénea que puede presentarse de diferentes formas y con un amplio espectro de manifestaciones. Puede cursar con formas leves y estables en el tiempo o formas graves rápidamente progresivas (32), Es una EAI que afecta sobre todo la piel, el tubo digestivo, los pulmones, los riñones y el corazón.

La ES se divide según su extensión cutánea en Esclerosis Sistémica Difusa y Limitada, otros subtipos de esta se pueden expresar sin afectación cutánea denominándose Esclerodermia, o sin Esclerodermia y cuando se encuentra con otra EA se conoce como síndrome de Overlap o solapamiento.

Tabla 1. Diferencias en formas clínicas de la enfermedad.

ES difusa	<ul style="list-style-type: none"> ● En zonas de las extremidades, la cara y el tronco. ● Corto tiempo entre el inicio del fenómeno de Raynaud y la afectación de los órganos internos, la fibrosis produce cambios atróficos e irreversibles. ● Curso clínico grave ● ANA (+) anticuerpos antiSc170 30%
ES limitada	<ul style="list-style-type: none"> ● En zonas distales a codos y/o rodillas,

	<p>y en la cara.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Fenómeno de Raynaud Se da mucho antes de afectación de otros órganos. ● La afectación dérmica aparece lentamente a lo largo de los años. ● Síndrome de CREST ● Curso clínico reservado ● ANA(+) anticuerpos anti centrómero 70%-80%
Esclerodermia sin esclerodermia	<ul style="list-style-type: none"> ● Con características vasculares y serológicas, pero sin afectación cutánea ● Daño de sistemas y órganos internos pero sin lesiones cutáneas o mínima tumefacción en los dedos.
Síndrome de solapamiento u overlap	<ul style="list-style-type: none"> ● Se expresan síntomas y signos de otras enfermedades sistémicas del tejido conectivo, normalmente Artritis Reumatoide, Dermatomiositis o Lupus Eritematoso Sistémico

Nota. Anticuerpos antinucleares (ANA) Tomada y adaptada de Ferrer y colaboradores (33)

2. 2 Epidemiología

La prevalencia e incidencia de la ES informada fue de 7,2 a 33,9 y de 13,5 a 44,3 por 100.000 personas en Europa y América del Norte, respectivamente. Las estimaciones de incidencia anual fueron de 0,6 a 2,3 y de 1,4 a 5,6 por 100.000 personas en Europa y América del Norte, respectivamente (14). Incluso, se han llevado a cabo estudios sobre proporción de afectación por género y se determinó que es mujer-hombre 3-6:1 y el grupo de edad de mayor frecuencia de afectación está entre los 45 y los 64 años (34).

Específicamente, en Colombia se estableció que la prevalencia de esta enfermedad es baja, ya que su estimación fue de 23,7 casos por 100.000 habitantes (sobre una población total de 47.663.162); esta enfermedad es más frecuente en el grupo de edad de 65 a 69 años en el sexo

femenino (77%), y tiene una relación mujer: hombre de 3,27:1(35). Aunque, a pesar de tener baja prevalencia, su mortalidad es elevada, debido a sus complicaciones pulmonares, que tienen el mayor efecto negativo en la calidad de vida en comparación con otras enfermedades reumáticas(36).

2.3 Manifestaciones clínicas

2.3.1 Afectación microvascular

La afectación microvascular se evidencia principalmente en lo que se conoce como el Fenómeno de Raynaud la cual es una manifestación que involucra los vasos sanguíneos, evidenciándose principalmente en manos y pies, Maurice Raynaud, lo definió como una “asfixia local de las extremidades”, caracterizada por episodios transitorios de vasoconstricción de las arterias y arteriolas de las extremidades en respuesta al frío o estímulos emocionales (37).

El fenómeno de Raynaud se describe clásicamente con un cambio de color trifásico de los dedos con blanco inicial o palidez (fase isquémica), luego azul o cianosis (fase de desoxigenación), seguido de rojo o eritema (fase de reperfusión), la palidez causada por la isquemia inducida por vaso espasmo, la cianosis causada por la hipoxia tisular, seguida del rubor causado por la reperfusión tisular (Figura 2) (38). El vasoespasmo es una respuesta vasoconstrictora excesiva que provoca la obliteración de la luz vascular. De este modo, el equilibrio entre la tensión de la pared arterial que favorece el taponamiento del vaso y la presión de distensión intravascular que induce la apertura del vaso es relevante para mantener la permeabilidad de un vaso sanguíneo, en contraste con los controles, los individuos con este fenómeno tienen una presión arterial braquial y digital más baja (39). Las alteraciones en la capilaroscopia, con pérdida de las asas capilares y de la morfología normal de los capilares en las uñas, distinguen a la ES del RP. En más del 90% de los pacientes con esclerosis sistémica

el fenómeno de Raynaud se asocia con fibrosis de los dedos, pérdida de los pulpejos, úlceras digitales y amputación digital (40).

Figura 2. Fases en Fenómeno de Raynaud.



Nota. (A) Fase isquémica; (B) fase de desoxigenación; (C) fase de reperfusión. Tomada de Shapiro y colaboradores (41).

2.3.2 Afectación cutánea

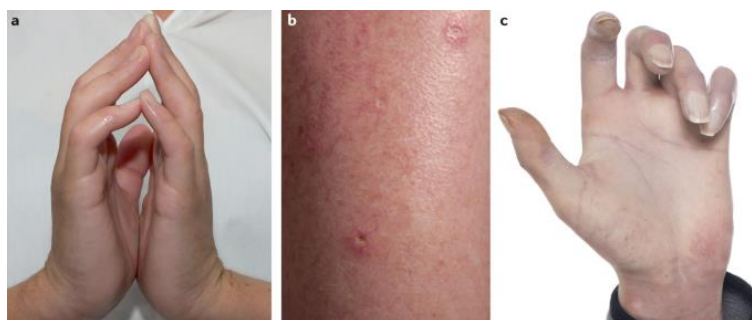
En la afectación cutánea dada por la ES se evidencia endurecimiento cutáneo, prurito, sequedad de la piel, disminución de la apertura oral, áreas de hiper- o hipopigmentación, aumento de los pliegues periorales, telangiectasias y calcinosis (33).

La afección cutánea característica de la ES progresa en tres fases. En la primera, la edematosa, que se debe al depósito en la dermis de glucosaminoglucanos, la piel está tensa con presencia de un edema difuso e indoloro, y pueden aparecer cambios de coloración, esta fase puede persistir y progresar de uno a tres años o más, de forma que, la inflamación y la fibrosis pueden cesar y aparecer en la fase atrófica. En la fase indurada el edema es reemplazado por un engrosamiento de presentación dura de la dermis que hacer perder los pliegues cutáneos, obstaculizando la movilidad de los dedos, especialmente la extensión, y la apertura; la epidermis se adelgaza, por lo que la piel se torna fina y brillante. Pueden aparecer trastornos de la pigmentación, por lo que la piel puede adoptar un aspecto moteado. Los dedos se afilan progresivamente y pueden aparecer úlceras en zonas distales (pulpejo de los dedos) o sobre

prominencias óseas, lo que les vuelve más vulnerables a los traumatismos. En la fase más tardía, la atrófica, el engrosamiento dérmico desaparece y vuelven a aparecer los pliegues cutáneos, aunque la epidermis y los anejos cutáneos permanecen atróficos. Hay atrofia de las puntas de los dedos, en las uñas y acortamiento de las falanges distales (42). Existen otras manifestaciones cutáneas como lo son las úlceras dolorosas que se pueden ubicar en los dedos y en los pliegues de flexión, se pueden presentar fisuras, manchas hipocrómicas o acrómicas que refieren a que tiene un color más claro en comparación al tono de piel (figura 3).

La escala más utilizada para determinar el grado y extensión de la afectación cutánea es la escala de Rodnan modificada, la cual se usa bajo el método de palpación de 17 áreas anatómicas, con puntuaciones que van de 0 (normal), 1 (engrosamiento leve), 2 (engrosamiento moderado) a 3 (engrosamiento grave con incapacidad de pellizcar la piel de un pliegue); su puntaje máximo es de 51, esta escala puede ser una herramienta útil y reproducible para el seguimiento de la historia natural de la enfermedad (43,44)

Figura 3. Afectación cutánea en la Esclerosis Sistémica.



Nota. (a) Fase edematosa (b) fase indurada, ulceración cutánea superficial (C) fase atrófica, contractura persistente. Tomada de Northern Care Alliance NHS Foundation Trust (45).

2.3.3 Síndrome de CREST

Refiere al acrónimo de la forma de la esclerosis limitada de la ES que refiere a:

- Calcinosis: Se define como el depósito de sales de calcio en la piel, aparece principalmente en EA, La calcinosis distrófica constituye el tipo más frecuente, los

niveles de calcio y fósforo en suero son normales. Aparece secundaria a un daño o alteración del colágeno, elastina o grasa subcutánea (46).

- Raynaud: Afectación microvascular que afecta los vasos sanguíneos y la coloración de los dedos de las manos y de los pies(38).
- Dismotilidad Esofágica: Caracterizada Por la dificultad para deglutir, regurgitar alimentos y se da un dolor tipo espasmo (47)
- Esclerodactilia: Es el endurecimiento y tirantez de la piel en los dedos de las manos y de los pies, lo que puede dificultar la flexión de los dedos y causar contracturas.
- Telangiectasias: Es una dilatación de los vasos sanguíneos en la superficie de la piel, que puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, aunque se ve más fácilmente en la piel (48)

2.3.4 Afectación orgánica

Tabla 2. Afectación orgánica en Esclerosis Sistémica.

Órgano afectado	Signos clínicos
Pulmón	<ul style="list-style-type: none"> ● Fibrosis intersticial pulmonar (FIP) asociada a ES difusa, se presenta en el 35-80% de pacientes ● Hipertensión arterial pulmonar (HAP) se presenta en el 15 % de pacientes ● Daño intersticial limitado asociado a ES limitada <p>(7,40)</p>
Corazón	<ul style="list-style-type: none"> ● En pacientes con ES difusa que cursan con miopatía de base. ● Disnea ● Dolor torácico anginoso ● Fibrosis miocárdica <p>(49)</p>

<p style="text-align: center;">Riñones</p>	<ul style="list-style-type: none"> • En pacientes con ES difusa de evolución rápida y progresiva. • El 10% de los pacientes con ES tienen crisis renal y en el 80% de ellos se desencadena durante los primeros cuatro años de la enfermedad. • Isquemia renal • Hiperplasia del aparato yuxtaglomerular. <p style="text-align: center;">(50)</p>
<p style="text-align: center;">Sistema gastrointestinal</p>	<ul style="list-style-type: none"> • En 75 y el 90% de los pacientes con ES presentan afectaciones gastrointestinales. • Fibrosis de la musculatura lisa intestinal • Peristaltis esofágica • Mala absorción • Estreñimiento <p style="text-align: center;">(44,51)</p>
<p style="text-align: center;">Sistema musculo esquelético</p>	<ul style="list-style-type: none"> • En el 45-90% de los casos de ES se presentan daños músculo esquelético. • Debilidad muscular • Artralgias y artritis • Tenosinovitis, roces y contracturas tendinosas • Resorción de los penachos de las falanges distales y desaparición de las falanges <p style="text-align: center;">(52,53)</p>

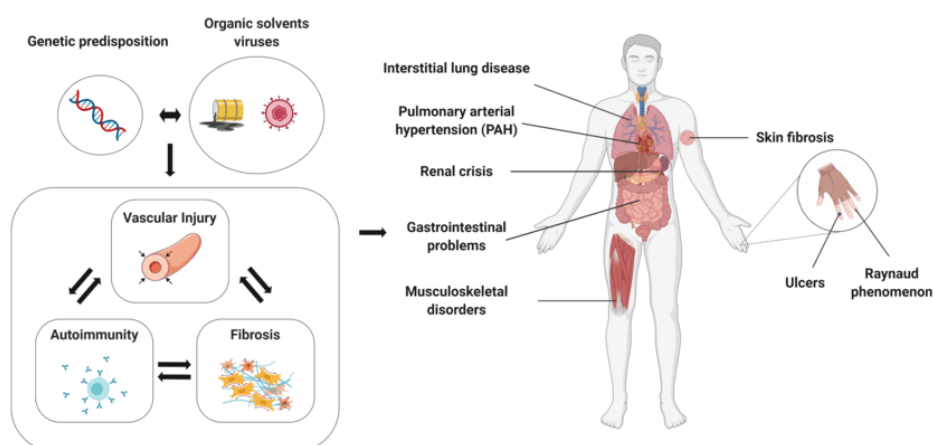
Nota. Creación propia.

2. 4 Fisiopatología de la esclerosis sistémica

En la fisiopatología de la ES convergen factores como la vasculopatía, fibrosis de tejidos y la activación del sistema inmune, los cuales son desencadenados a partir de una predisposición genética y factores ambientales, los cuales explican la heterogeneidad de la enfermedad. A partir del daño vascular se da el inicio a los diferentes mecanismos que desarrollan la ES, dada

por una angiopatía que desencadena cambios en arterias digitales, pulmonares y disfunción en la microcirculación, seguido a esto se produce un isquemia que favorece la fibrosis, de allí, los fibroblastos se convierten en miofibroblastos esto estimulado por ciertas moléculas profibróticas, sumado a esto, se inicia una respuesta inmune exacerbada donde se involucran e infiltran diferentes células que funcionan como mediadores inmunológicos que empiezan atacando el propio organismo y de la misma manera, generando anticuerpos(54).

Figura 4. Triada fisiopatológica en Esclerosis Sistémica.



Nota. A partir de los factores ambientales o genéticos, se desencadena un daño vascular acompañado de una respuesta inmune anormal y un daño fibrótico lo que conlleva a diversas manifestaciones clínicas. Tomada de De pieri y colaboradores (55).

2.5 Factores ambientales, genéticos y epigenéticos

La patogenia de la ES aunque no es del todo clara, se ha demostrado que el inicio de la enfermedad se da por la interacción de factores ambientales, epigenéticos y genéticos que conducen a la aparición y progreso de la ES en pacientes genéticamente susceptibles. Hasta la fecha, se ha establecido que las modificaciones epigenéticas se caracterizan por cambios tanto estables como hereditarios en la expresión génica sin modificaciones en la secuencia de ADN original. Se han identificado tres características epigenéticas determinantes en la ES, las cuales son: *la metilación del ADN* la cual desregula muchas de las células; *La modificación de histonas* que contribuye al deterioro de transcripción de genes modulando la expresión génica

y *Perfil de MicroARN* que resulta en un proceso profibrótico donde investigadores han demostrado pacientes con ES, en comparación con sujetos sanos, que presentaban ex vivo niveles más bajos de miR-29 catalogado como antifibrótico, el cual actúa sobre el colágeno (56).

Los factores genéticos, de la misma manera, se han visto involucrados como factores predisponentes en la enfermedad en donde se ha estudiado la influencia de genes HLA como lo son HLA (A23, B18 y DR11) que han sido implicados en la ES y, aunque no están relacionados con subconjuntos clínicos específicos, se asocian con características clínicas más graves y genes no asociados a HLA identificando polimorfismos no HLA rs11642873 en el gen IRF8 y rs12540874 en el gen GRB10 mostraron una asociación sugestiva con ES a nivel de GWAS (57). Estas propiedades junto con los factores ambientales los cuales han sido investigados en exposición a sílice, asbesto, pesticidas, material particulado, entre otros factores que pueden influir en el riesgo de desarrollar ES (58).

2.6 Vasculopatía

A partir de estímulos genéticos o ambientales, el daño vascular consiste en grandes espacios entre las células endoteliales, pérdida de la integridad del revestimiento endotelial y la vacuolización del citoplasma de las células endoteliales, llevando a apoptosis, además, las células endoteliales afectadas liberan patrones moleculares asociados al daño (DAMPS) los cuales reclutan células inmunitarias, acompañado de una expresión alterada de proteínas de adhesión y citocinas, donde, se origina una hipoxia crónica provocando un daño continuo y pérdida de los capilares, lo que resulta en, proliferación de células del musculo liso que engrosa progresivamente la pared del vaso y ocasiona que los precursores de las células endoteliales tengan inconvenientes en su proliferación y maduración (6).

El daño microvascular se asocia con una mayor expresión de moléculas de adhesión endotelial, incluida la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) y la E-selectina, las cuales se unen a glóbulos blancos y plaquetas lo que ocasiona la migración de estos a través del endotelio hacia la matriz extracelular, así mismo, se encuentran las endotelinas que en su función de vasoconstricción supone una relación entre el daño endotelial y la activación de fibroblastos (59).

2.7 Respuesta inmune

2.7.1 Inmunidad innata

La señalización inmune innata ha sido reconocida a través de los receptores tipo Toll (TLR) siendo un factor clave de la respuesta fibrótica constante en la ES, relacionándose con el tejido atrofiado, activando a las células dendríticas que dentro de sus funciones secreta citoquinas proinflamatorias y presenta los antígenos a las Células T para ser activadas. Se ha informado que TLR2, TLR4 y TLR8 se encuentran aumentados en fibroblastos y lesiones de piel en pacientes con ES (60,61). Por consiguiente, la activación de células dendríticas por medio de los TLR, conduce a que se produzcan diversas citoquinas proinflamatorias y detalladamente Interferones de tipo I (IFN-I), de forma que, se ha encontrado que IFN-I se puede hallar en sangre y suero de pacientes que padecen de ES (62,63). A partir de estudios genéticos realizados se ha encontrado la implicación de Factor Regulador de Interferón IRF5 activado por TLR4 y STAT4 relacionado con el incremento de interleuquinas y células T helper, no solo teniendo presencia en la fibrosis cutánea, sino expresándose también en el inicio de la enfermedad (64,65).

El efecto de IFN-I en células inmunes se asocia a la activación de monocitos e igualmente de la proliferación, activación y supervivencia de células dendríticas, células T y células B (66).

2.7.1.1 Macrófagos y monocitos

Los macrófagos y monocitos son células que regulan y efectúan un papel trascendental en el sistema inmunológico. Dependiendo de su estado de activación, pueden influir en una cascada de respuestas inmunes. El fenotipo activado M1, también conocido como fenotipo clásico, se origina a partir de dos señales: interferón-gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF).

Esta combinación resulta en una población de macrófagos con potentes capacidades microbicidas o tumoricidas, que secretan altos niveles de citocinas y mediadores proinflamatorios, produciendo factores para fibroblastos y células endoteliales, que promueven la reparación de los tejidos dañados. Por otro lado, se encuentran el fenotipo activado M2 descritos en infecciones parasitarias, de carácter proinflamatorio/antiinflamatorio y de activación alternativa. Estas células han sido evidenciadas como parte de la infiltración en espacios intersticiales y perivasculares dérmicos de pacientes con ES. Los monocitos CD14+ junto con los macrófagos circulante tienen marcadores de activación y diferenciación como lo son CD163 Y CD204 que se caracterizan por expresar mayoritariamente mediadores proinflamatorios y fibrogénicos como TGF- β (67). Bajo modelos murinos se pudo evidenciar la infiltración dérmica de macrófagos, acompañada de una elevada expresión de ARNm de citoquinas y quimioquinas como TGF- β , MCP-1, MIP-1a. Igualmente, se observó una buena relación entre las células inflamatorias y el desarrollo de la fibrosis cutánea y pulmonar (68). Se ha manifestado actualmente que los monocitos que expresan CD16 van a estar elevados en pacientes que padecen de ES y estos se correlacionan con la gravedad de la fibrosis, de igual modo, estos pacientes secretan IL-6 y MCP-1 que influyen en el infiltrado celular y la fibrosis, así, tanto los monocitos como los macrófagos de tipo II están implicados en la fibrosis de la enfermedad y se pueden encontrar en sangre, piel y pulmones de pacientes con ES (69,70).

2.7. 2 Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa está representada principalmente por los linfocitos T y B. Como se ha establecido, la respuesta inmune adaptativa se genera a partir de la activación de las células del sistema inmune innato las cuales alertan al organismo y de esta forma se origina una respuesta celular(71).

2.7.2.1 Células T

Se ha considerado que la producción selectiva de citoquinas por parte de los linfocitos T tiene un impacto fundamental en el papel de las células endoteliales y los fibroblastos, con posibles consecuencias que promueven o inhiben la enfermedad vascular y síntesis excesiva de colágeno, de allí, las células T en ES y fibrosis son extremadamente heterogéneas en términos de expresión del receptor de células T (TcR) (72). Las células T CD4+ se han caracterizado en conjuntos de células T ayudadoras de tipo 1 (Th1) mediando la respuesta intracelular y células ayudadoras de tipo 2 (Th2) presentes en la respuesta humoral. En la piel de pacientes con ES se ha evidenciado una molécula de adhesión intracelular (ICAM-I) ligando para el receptor el antígeno 1 asociado a linfocitos que se encuentra en la superficie de células T (73). Las células T de biopsias de piel de pacientes con ES mostraron una mayor expresión del marcador CD69 el cual sugiere que las células T pueden participar activamente en el contacto célula-célula con los fibroblastos para promover la fibrosis, por otro lado, TGF- β ya asociado a la enfermedad, está relacionado igualmente con el reclutamiento de células T (74).

En medio de la activación de la respuesta inmune adaptativa en linfocitos T CD4+, se producen mediadores en el progreso de la enfermedad, tipo Th1 como IL-12 e IFN- γ , en Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13. Particularmente, la ES se caracteriza por el desequilibrio de Th1/Th2, con una polarización de Th2 donde se promueven procesos fibróticos, independientes de cualquier factor (75,76).

Se ha encontrado principalmente el aumento de Th2 en tejidos y sangre de pacientes que padecen de ES, siendo inducida por la producción de IL-4, IL-13 y células T CD8+. Lo cual conlleva a la estimulación de fibroblastos, desencadenando un incremento en la secreción de colágeno, aumentando la fibrosis (61,77).

2.7.2.2 Células B

Las células B, tiene un rol trascendental en el progreso de la ES produciendo auto anticuerpos, los cuales son fundamentales en el diagnóstico clínico y evidencian la activación de estas células en la patogénesis de la enfermedad. Los auto anticuerpos anticentrómero y anti-topoisomerasa I orientan a la clasificación de las formas de la patología sea limitada o difusa (78).

Estas células también están implicadas en funciones como presentación de antígenos, producción de citoquinas, organogénesis linfoide y diferenciación y/o activación de células T, células dendríticas, macrófagos, lo que demuestra que anomalías en estas funciones igualmente podrían conducir a autoinmunidad. En cuanto al proceso de fibrosis que atraviesa la enfermedad, se ha estudiado que las células B desempeñan un papel patogénico en la fibrosis tisular, incluida la esclerosis cutánea, la enfermedad intersticial, la fibrosis intersticial renal y la fibrosis hepática (79).

Las células B activadas también liberan abundantes cantidades de factor de crecimiento transformante (TGF)- β , que principalmente es liberado por macrófagos, siendo reconocido este factor como uno de los elementos clave en el desarrollo de la fibrosis. De manera que, (TGF)- β tiene la capacidad de estimular la producción de componentes de la matriz extracelular como el colágeno tipo I, colágeno tipo III, fibronectina, proteoglicanos y glicosaminoglicanos en células de tejido conectivo (fibroblastos) (80).

2.7.2.3 Células dendríticas

Las células dendríticas (CD) eficazmente impulsan la activación de las células T vírgenes, desempeñando un papel esencial en el inicio y la configuración de las respuestas inmunológicas. Estas células expresan una variedad de receptores diseñados para detectar moléculas relacionadas con patógenos o amenazas, tanto en el entorno extracelular como en el intracelular (81), del mismo modo, son importantes para mantener la homeostasis de las células T periféricas y prevenir la activación inadecuada de las células (82).

En los tejidos que funcionan como barreras, como la piel y los pulmones, las células dendríticas (CD) desempeñan un papel crucial en la determinación de la gravedad de la respuesta inflamatoria y, por lo tanto, en el desarrollo de enfermedades inflamatorias. Los diversos subtipos de células dendríticas, como CD1, CD2 y células dendríticas plasmocitoides (CDp), no solo se encuentran en la circulación sanguínea, sino que también están presentes en varios tejidos, especialmente en los ganglios linfáticos regionales y las superficies mucosas (83). Las CDp se infiltran en gran medida en la piel de los pacientes con ES y liberan grandes cantidades de CXCL4 e IFN- α , además, se determinó que la activación de TLR-8 está implicado en el incremento de estas (84).

2.8 Citoquinas implicadas en la Esclerosis Sistémica

Se han estudiado diversas citoquinas que se ven inmersas en la ES como lo son con mayor implicación TGF- β , PDGF, CTGF, TNF- α seguido de IL-6, IL-4, IL -10, IL-13, IL-1, IL-2 e IL-17 que indican que las citocinas están relacionadas con la patogénesis de la ES. De estas citoquinas, IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 e IL-17 son producidas principalmente por linfocitos T, pero muchos tipos de células, incluidas las T, pueden secretar IL-6 y TGF- β (85). A continuación, se muestran sus funciones en el desarrollo de la enfermedad (Tabla 2).

Tabla 3. Citoquinas implicadas en la Esclerosis Sistémica.

Citoquina	Función en ES	Referencia
<i>TGF-β</i>	Activación y migración de fibroblastos, promoción de componentes de la ME	(86)
<i>PDGF</i>	Promueve la inflamación, fibrosis, angiogénesis, induce expresión de TGF-β	(87)
<i>CTGF</i>	Regula la proliferación y migración de fibroblastos	(88)
<i>ET-1</i>	Daño endotelial y activación de fibroblastos, producción ME	(89)
<i>IL-1</i>	Regula la fibrosis y media la inmunidad	(85)
<i>IL-2</i>	Activación linfocitos T autorreactivos	(90)
<i>IL-4</i>	Factor estimulante de células B, regula síntesis de colágeno, profibrótico	(85)
<i>IL-6</i>	Promueve inflamación y regula expresión de α-SMA	(87)
<i>IL-10</i>	Proliferación de linfocitos B y mediador antiinflamatorio	(85)
<i>IL-13</i>	Induce expresión de TGF-β	(85)
<i>IL-17</i>	Proliferación de fibroblastos	(85)
<i>TNF-α</i>	Recluta linfocitos, proinflamatorio y antifibrótico	(85)

Nota. Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β). Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). Endotelina 1 (ET-1). Interleucina (IL). Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α). Actina del músculo liso alfa (α-SMA). Creación propia.

2.9 Fibrosis

La fibrosis es un proceso cicatricial que se encuentra en la evolución de la mayoría de las enfermedades sistémicas, ya sea inflamatoria o no. La fibrosis tiene un carácter “universal” en las enfermedades, porque es capaz de afectar a todos los órganos de cada dispositivo o sistema (91). Los fibroblastos y los miofibroblastos activados dejan tejido conjuntivo fibroso, de

manera que la fibrosis sustituye gradualmente a la fase inflamatoria, transforma la arquitectura del tejido afectado y produce la mayoría de los signos (32). En el tejido cutáneo la fibrosis se da principalmente en la dermis profunda y en la parte superficial del tejido celular subcutáneo, esta incrementa dado que la microvasculatura se va destruyendo, así que, para que se lleve a cabo el proceso, se media con citoquinas y diferentes vías de señalización que permiten el inicio de este mecanismo (92)

2.9.1 Pericitos y células musculares lisas

Los vasos pequeños se conforman de músculo liso, células y pericitos. Los pericitos tienen la capacidad de ser modificados en células musculares lisas de la pared vascular, fibroblastos y miofibroblastos, y hacer parte de la proliferación de células endoteliales. Los pericitos y las células musculares son las células que siguen proliferando a comparación de las células endoteliales que entran en apoptosis(6).

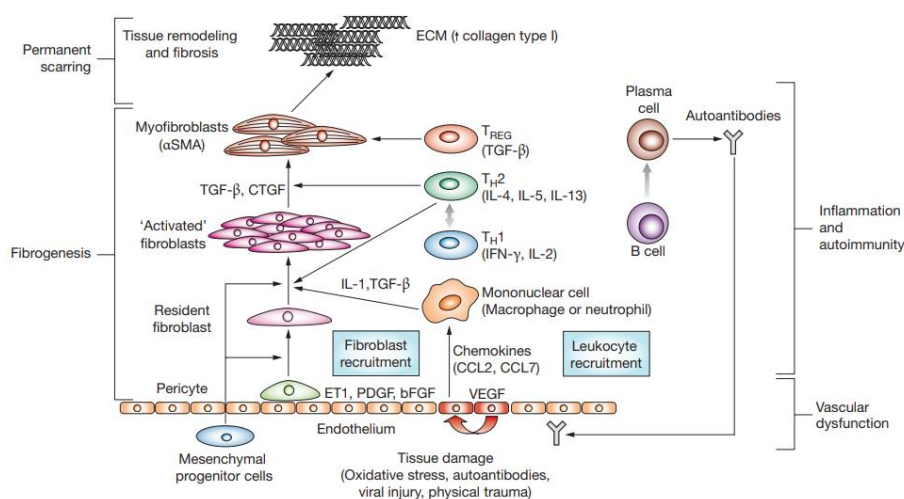
2.9.2 Fibroblastos

Los fibroblastos tienen como función principal en nuestro sistema formar las fibras de tejido conectivo como lo son el colágeno y la elastina, además, produce citoquinas con la capacidad de promover la destrucción tisular(93). La sobreproducción de colágeno en ES es atribuida a una transcripción mejorada o una mayor estabilidad del ARN mensajero específico del colágeno y tensiones de oxígeno bajas. Así, estas células pueden convertirse en miofibroblastos, sobreexpresando varias citoquinas como lo son TGF- β y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), igualmente, presentando especies reactivas de oxígeno (ROS) (86), los incrementados niveles de ROS son consecuencia directa de la activación de células sanguíneas mononucleares, en la ES parecen indiferentes del estado inflamatorio e inducen daño en el ADN, además, los radicales libres tienen efectos pro fibrogénicos en los fibroblastos. El receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PDGF que se encuentra inmerso en la transformación pericitos a fibroblastos y a su vez estimula la producción de ROS (87).

La señalización constitutiva mejorada del TGF- β puede resultar de los niveles elevados del receptor del factor de crecimiento transformante beta tipo I y/o de la activación inapropiada de Smad3. Estas alteraciones de la señalización del factor de crecimiento transformante beta en los fibroblastos de la esclerosis sistémica pueden facilitar una mayor producción de colágeno in vivo incluso en condiciones de baja disponibilidad de ligando (94).

Figura 5. Fisiopatología de la Esclerosis Sistémica y sus mecanismos.



Nota. El daño inicialmente afecta al endotelio y desencadena una respuesta inflamatoria. En la ES la lesión vascular repetida y la respuesta inflamatoria inapropiada llevan a la acumulación de células inmunes en los tejidos afectados. Esto incluye la activación de células T tipo 2 y la liberación de citocinas profibróticas, lo que promueve la activación de fibroblastos y la producción de matriz extracelular. Esto a su vez conduce a la fibrosis, contracción del tejido y cicatrización permanente en los tejidos conectivos. Tomada de Denton y colaboradores (95).

2.10 Criterios de clasificación

Los primeros estándares para la clasificación de la ES en 1980 fueron propuestos por el subcomité encargado de los criterios de ES perteneciente al Comité de Criterios Terapéuticos y Diagnósticos de la Asociación Estadounidense de Reumatismo. Para ese momento, estos

criterios ya validaban la importancia de la serología autoinmune, que se basaba en el uso de pruebas de inmunofluorescencia indirecta a partir de un cultivo de células epidermoides humanas (IFI) HEp-2 para la detección de los anticuerpos anticentrómero (ACA) y los anticuerpos anti-topoisomerasa I (ATA), anteriormente conocidos como anti-Scl70. En el 2001, se definieron los criterios de LeRoy y Medsger para la clasificación de la esclerosis sistémica temprana, los cuales incluyen un grupo extenso de autoanticuerpos de los cuales los que fueron añadidos no proporcionaron evidencia de correlación con la enfermedad en su título 1:100. En definitiva, en el año 2013 una colaboración entre el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) condujo a la creación de un conjunto actualizado de criterios de clasificación para la ES (96,97).

Tabla 4. Criterios de clasificación EULAR 2013.

Item	Sub-item	Puntaje
Engrosamiento de la piel de los dedos de ambas manos que se extiende proximalmente a las articulaciones	-	9
Engrosamiento de la piel de los dedos	Dedos hinchados Esclerodactilia	2 4
Lesiones en las yemas de los dedos	Úlceras digitales Cicatrices	2 3
Telangiectasia	-	2
Capilares ungueales anormales	-	2
Hipertensión arterial pulmonar y/o enfermedad pulmonar Intersticial		2
Fenómeno de Raynaud		3
Autoanticuerpos relacionados con ES	Anticentrómero (ACA) Anti-topoisomerasa I (ATA) Anti-RNA polimerasa III	3

Nota. La puntuación total se determina sumando el peso máximo (puntuación) en cada categoría. Los pacientes con una puntuación total de 9 se clasifican como que tienen ES definitiva. Tomada y adaptada de Van Den Hoogen y colaboradores (98).

2.11 Evaluación de autoanticuerpos

El rol de la positividad de Anticuerpos antinucleares (ANAs) han sido identificados como tempranos en la enfermedad, dependiendo del patrón presentado determinan el desarrollo de subtipos y manifestación clínica de ES. El anti-Scl-70, anti-U3RNP, anti-Th/To y anti-Pm/Scl se relacionan más a la enfermedad pulmonar intersticial (EPI), sin embargo, la hipertensión arterial (HAP) aparece a menudo en presencia de anticentrómero, anti-U3RNP, anti-Th/To (99).

Tabla 5. Autoanticuerpos y su asociación en Esclerosis Sistémica.

Autoanticuerpo	Clasificación	Asociación
Anti-Scl-70 (ATA)	Anti-ADN anticuerpo topoisomerasa	ES difusa, fibrosis pulmonar
Anticentrómero Ab (ACA)	Proteína anti-centrómero	ES limitada, HAP
Anti-Pm-Scl	Anticuerpo proteína nucleolar	Overlap
Anti Th/To	Anticuerpo RNA ribonucleoproteína	ES limitada, pericarditis
Anti-RNA polimerasa I y III	Anticuerpo RNA polimerasa	ES difusa, afectación renal

Nota. Tomada y adaptada de Bazsó y colaboradores (99).

En cuanto a la prevalencia de detección de estos autoanticuerpos se pudo establecer que el anticuerpo anti-topoisomerasa I (ATA) se encuentra asociado en el 20-30 % de los pacientes con ES, de forma que, tres cuartas partes de los pacientes con este anticuerpo se relaciona con la ES difusa. Por otro lado, el anticuerpo anticentrómero (ACA) se presenta en 20 a 25 % de la mayoría de las poblaciones con ES y está fuertemente asociada con ES limitada, además, el

anticuerpo más específico de la ES, el anti-ARN polimerasa III, desencadena un engrosamiento cutáneo difuso rápidamente progresivo, encontrándose una mayor frecuencia en pacientes caucásicos y británicos de América del Norte (20-25%) en comparación con pacientes de Europa continental o japoneses (5%), así mismo, los anticuerpos Th/To se expresan en menos del 5 % de los pacientes con ES, y casi todos tienen ES limitada. Según lo expuesto anteriormente, se puede constatar, que estas prevalencias a pesar de que los ANAs de hagan parte de los criterios de diagnósticos no se van a presentar en la totalidad de los pacientes con ES, no excluye su diagnóstico de la enfermedad, incluso, existe una pequeña tasa de ANA negativos para ES y muestra un subtipo distinto de enfermedad, con menos vasculopatía, pero afectación gastrointestinal inferior más frecuente y curso grave de la enfermedad (100,101).

2.12 Tratamiento

Dado que no se comprende completamente la causa de la ES, el enfoque terapéutico se basa en medicamentos que modifican la enfermedad y se adaptan a las necesidades de los órganos afectados. Las decisiones sobre el tratamiento dependen de la evaluación de los síntomas, la duración de la enfermedad, su actividad y las complicaciones. Actualmente, no existe un tratamiento específico recomendado para la miopatía relacionada con la ES. En casos de miopatía inflamatoria, se sugieren glucocorticosteroides (GC), pero en ausencia de inflamación, es posible que los pacientes no requieran tratamiento, en la tabla 4 se describen los medicamentos usados(102).

Tabla 6. Tratamiento recomendado para Esclerosis Sistémica.

Anomalía	Medicamento
Fenómeno de Raynaud	Antagonistas de canales de calcio
	Inhibidores PDE 5 – sildenafil

	Iloprost
	Alprostadil
Lesiones en la punta de los dedos	Iloprost
	Inhibidores de la PDE 5: sildenafil, tadalafil
	Antagonista del receptor de endotelina – bosentan
Afectación de la piel/fibrosis de órganos internos	Metotrexato
	Ciclofosfamida
	Micofenolato de mofetilo
Hipertensión pulmonar	Antagonista del receptor de endotelina: bosentan, ambrisentan, macitentan; inhibidores de PDE-5; riociguat
	Epoprostenol
	Iloprost, Treprostinilo
Crisis renal	Inhibidores de la ECA
Afectación gastrointestinal	Inhibidores de la bomba de protones
	Agentes procinéticos
	Células madre autólogas, trasplante

Nota. Fosfodiesterasa- 5 (PDE-5). Tomada y adaptada de Sobolewski y colaboradores (54).

2.13 Biomarcadores

Los estudios biomarcadores han ingresado en una nueva era llena de avances en términos de diagnóstico temprano y tratamiento eficaz para numerosas enfermedades. Un biomarcador se define como una característica que se mide y evalúa de manera objetiva, y que funciona como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas a una intervención terapéutica. Estos se pueden clasificar en diferentes grupos de acuerdo a su funcionalidad en diferentes etapas de la enfermedad, las cuales se muestran en la tabla 7 (103).

Tabla 7. Tipos de biomarcadores.

Biomarcador	Definición
<i>Biomarcador de pronóstico</i>	Son usados para predecir el curso futuro de la enfermedad, incluida la recurrencia, la respuesta a terapia y el seguimiento de la eficacia de esta.
<i>Biomarcador de respuesta</i>	Son usados para demostrar que se ha dado una respuesta en el organismo, sea buena o mala, en un paciente expuesto a un agente.
<i>Biomarcador de antecedentes</i>	Se usan para identificar la probabilidad de desarrollar una enfermedad.
<i>Biomarcador de diagnóstico</i>	Son usados para detectar o comprobar la existencia de una enfermedad o identificar subtipos.

Nota. Tomada y adaptada de Chen X y colaboradores(104)

2.13.1 Biomarcadores séricos propuestos para Esclerosis Sistémica

A lo largo de diferentes estudios en la ES se han propuesto diferentes biomarcadores séricos que identifican el progreso, la fisiopatología y el acercamiento terapéutico al paciente. Además, permitirían distinguir pacientes de alto riesgo clínico, hallando predictores de la evolución de esta patología. Se han establecido factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y

moléculas de adhesión como candidatos a biomarcadores de diagnóstico en la enfermedad (tabla 8) (105).

Tabla 8. Biomarcadores séricos propuestos para Esclerosis Sistémica.

Clasificación según función	Biomarcador	Asociación
Factores de crecimiento	TGF- β \uparrow	ES difusa, úlceras digitales
	TGF- β \downarrow	ES difusa
	VEGF \uparrow	Afectación de órganos sistémicos, HAP
	VEGF \downarrow	Úlceras digitales
	CTGF \uparrow	Enfermedad Intersticial Pulmonar
Citoquinas	IL-6 \uparrow	ES progresiva temprana, mal pronóstico
	BAFF \uparrow	Progreso respuesta inmune en ES
Quimioquinas	CCL2 \uparrow	Enfermedad Intersticial Pulmonar
	CCL4 \uparrow	Fibrosis pulmonar, HAP, progreso de la enfermedad
	CCL18 \uparrow	Predice la disfunción física en la enfermedad
	CCL10 \uparrow	ES temprana
	CX3CL1 \uparrow	Enfermedad Intersticial Pulmonar, úlceras digitales, ES difusa
Moléculas de adhesión	ICAM-1 \uparrow	Progreso rápido de la enfermedad, ES difusa, afectación articular, predice disfunción respiratoria
	VCAM-1 \uparrow	Afectación sistémica, crisis renal, actividad de la

		enfermedad
	E-selectina ↑	Afectación sistémica, crisis renal, actividad de la enfermedad
	Endostatina	HAP
	Endotelina-1	HAP, afectación sistémica, microangiopatía

Nota. ↑ regulado al alza; ↓, regulado a la baja; TGF-β, factor de crecimiento transformante, VEGF factor de crecimiento endotelial vascular, CTGF, factor de crecimiento del tejido conectivo, BAFF factor activador de células B, ICAM-1 molécula de adhesión intercelular 1, VCAM-1 molécula de adhesión vascular 1. Tomada y adaptada de Utsunomiya A y colaboradores (105).

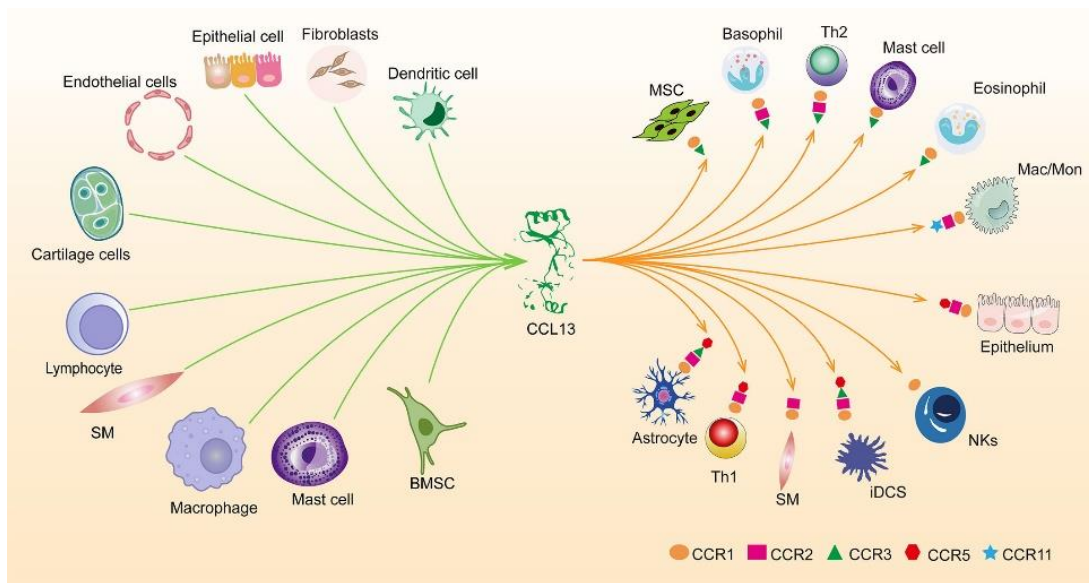
2.14 Proteínas quimioatrayentes MCP Y MCP-4/CCL13

El grupo CC está ubicado en el cromosoma 17 humano está compuesto por la región MCP y la región MIP. La región MCP humana consta de seis quimioquinas: CCL1 (I-309), CCL2 (MCP-1), CCL 7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL11 (Eotaxina-1) y CCL13 (MCP-4) (107), están implicadas en diversos mecanismos fisiopatológicos que implican específicamente infiltración de células mononucleares, incluida la remodelación de tejidos, la aterosclerosis y la metástasis del cáncer (108).

La proteína quimioatrayente de monocitos 4 (MCP4) o también conocida como CCL13, Es un quimioatrayente para monocitos, células T y dendríticas inmaduras; se une a receptores acoplados a proteína G específicos, como lo son los receptores CCR1 , CCR2 , CCR5 y CCR11 , siendo el único MCP que se une a CCR3, y junto con CCL11, iniciando una cascada de señales dentro de la célula, asimismo, MCP4 es uno de los más importantes quimioatrayentes de eosinófilos (109), además de ser una quimioquina que está implicada en inducir la degranulación de los eosinófilos, la liberación de histamina de los basófilos, la expresión de moléculas de adhesión y secreción de citocinas proinflamatorias en células

epiteliales, endoteliales y musculares, esta quimioquina se expresa extensamente en condiciones homeostáticas en diferentes tejidos como el intestino delgado, colon, pulmón, corazón, placenta, timo, hígado, músculo, riñón, páncreas, próstata, testículo y ovario, en donde cumple un papel trascendental en la circulación de leucocitos, incluso, provoca la expresión de moléculas de adhesión y la producción de citoquinas proinflamatorias en células endoteliales, células epiteliales y células musculares. (110).

Figura 6. Descripción general de las células que liberan MCP4 a nivel de proteína y la expresión de cinco receptores para esta proteína en las células.

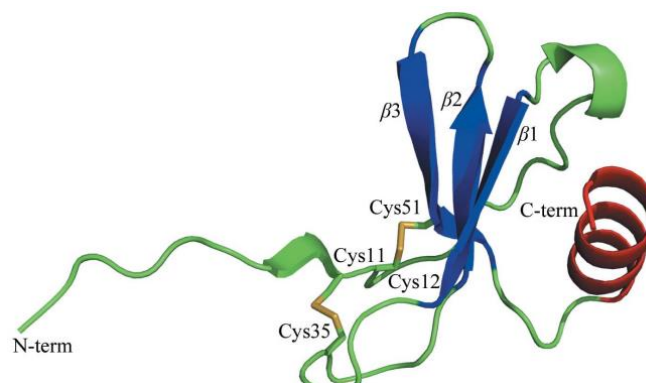


Nota. Células del músculo liso (SM), macrófagos (Mac), monocitos (Mon), células dendríticas inmaduras (iDC), natural killer (NK), linfocitos T helper (Th), células estromales de la médula ósea (BMSC). Tomada y adaptada de Li L y colaboradores (111).

2.14.1 Estructura proteica de MCP4

MCP4 está compuesta por 98 aminoácidos y después de la escisión por la péptidasa señal, la proteína contiene 75 aminoácidos con una glicina amino terminal, que se conserva entre miembros de la familia MCP (110). Esta proteína, mantiene una conformación terciaria semejante a la de otras quimioquinas de la familia CC, con una hoja B central antiparalela de tres cadenas y una hélice en el extremo carboxilo. El extremo amino de la molécula forma un bucle que se une al resto de la proteína mediante puentes disulfuro (108).

Figura 7. Estructura de MCP4



Nota. La hoja central anti paralela de triple hebra es de color azul y la hélice C-terminal es de color rojo. Los dos puentes disulfuro (Cys11 – Cys35 y Cys12 – Cys51). Tomada de Barinka y colaboradores (112).

2.14.2 MCP4 en el proceso de inflamación

La inflamación procede de una respuesta contra patógenos o daños celulares, así que, de esta forma, por medio de patrones de reconocimiento convergen en vías de señalización impulsando la liberación de moléculas proinflamatorias que son comandados al sitio de inflamación por NF-KB. De esta forma, MCP4 ha demostrado estar aumentada en ARNm y receptores tipo Toll (TLR) 2, 3,4 Y 5, igualmente, en su unión al receptor CCR2 expresado en diversas células induciendo a la maduración y liberación de CD. Su rol en las CDs está dado por su capacidad de respuesta expresando el epitelio basal que entran en contacto con los vasos sanguíneos, luego las células se reclutan en el tejido por un gradiente diferente de quimioquinas, además, está implicado en la activación y su liberación propia en células que hacen parte de los procesos inflamatorios como macrófagos, monocitos, Th1,Th2 mastocitos, Células dendríticas inmaduras, Natural Killer, células epiteliales, eosinófilos, basófilos, células endoteliales y fibroblastos (109).

2.14.3 MCP4 y enfermedades autoinmunes

La proteína MCP4 se ha visto incrementada en diferentes EAIs , en la AR se ha determinado que esta elevada en tejidos sinoviales y cartilagosos en los cuales se produce el foco de

inflamación de la patología, sabiendo que las células involucradas en la enfermedad y que a la misma vez liberan MCP4 son los fibroblastos y los condrocitos sinoviales, donde el IFN- γ en combinación con interleucina-1beta/factor de TNF- α activa la producción de MCP4 a partir de condrocitos en las articulaciones de la AR, y ese MCP4 secretado mejora la proliferación de sinoviocitos similares a fibroblastos activando la señal extracelular (24). Además, varios estudios han demostrado que MCP4 puede producirse en respuesta a diferentes estímulos por parte de otros tipos de fibroblastos, como los dérmicos (22,113). Del mismo modo, esta proteína se ha estudiado en el SS, LES, dermatomiositis y ES donde se estableció que se encuentra elevado únicamente en la ES (31).

2.14.4 MCP4 y ES

Dos estudios han investigado los niveles MCP4 en pacientes con ES y su rol en la fisiopatología. Gambichler y su equipo llevaron a cabo un estudio que investigó la quimioquina MCP4 en pacientes con ES en comparación con otras enfermedades de la piel y trastornos autoinmunes. Sus hallazgos revelaron que los niveles de MCP4 no mostraron diferencias significativas entre los diferentes subgrupos de ES. Además, observaron que estos niveles permanecían estables a lo largo del tiempo en ausencia de tratamiento, ya que el tratamiento podía reducir sus concentraciones. Asimismo, notaron que las concentraciones de MCP4 en pacientes con ES no diferían de manera significativa de las de individuos sanos, y, de hecho, eran más elevadas en casos de Dermatitis Atópica y psoriasis.(114).

Sin embargo, Yanaba y colaboradores informaron niveles séricos de MCP4 en pacientes que padecían ES con tratamiento de esteroides y D-penicilamina, en comparación con otras EA. Donde demostraron que los niveles de esta quimioquina eran elevados en ES a comparación de las demás enfermedades, no se distinguió un aumento significativo entre ES difusa y limitada, igualmente, informaron que en el periodo de tiempo estudiado la proteína no tuvo

cambio en sus niveles ni en los subtipos de la enfermedad, estableciendo que MCP4 podría desempeñar un papel fundamental como biomarcador estable, independientemente de la gravedad de la enfermedad. Se propone que uno de los posibles mecanismos subyacentes radica en la lesión de reperfusión originada durante el fenómeno de Raynaud. Esta lesión desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales, a su vez, ocasionan daño en el endotelio vascular y estimulan la proliferación de fibroblastos, generando así la fibrosis. En este contexto, MCP4 podría influir como inductor en la producción de ROS, contribuyendo al desarrollo de estos procesos patológicos (31,115).

3. DISEÑO METODOLOGICO

3.1 Universo, población y muestras



Figura 8. Representación gráfica de universo, población y muestra del estudio.

Nota. Creación propia.

Este estudio se realizó con la base de datos del grupo CREA a partir de una cohorte de 2149 pacientes que fueron diagnosticados con diferentes enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple (EM), AR, SS, ES, enfermedad tiroidea autoinmune (AITD) y síndrome anti fosfolípido (ASP), de allí se tomaron como población 126 pacientes que fueron

diagnosticados con ES y como muestra 36 pacientes con ES que cumplieran con los ítems de clasificación ACR/EULAR 2013 como criterio de inclusión. Asimismo para el estudio se tomaron 36 controles sanos.

- Criterios de inclusión
 - Nacionalidad colombiana
 - Mayores de 18 años de edad
 - Cumplimiento de los criterios de ACR/EULAR 2013
 - Asisten a consulta de reumatología del Centro de Estudio de Enfermedades CREA. Autoinmunes, CREA, de la Universidad del Rosario.
 - Pacientes con consentimiento informado avalado por el comité de ética.
 - Pacientes diagnosticados en el subgrupo de Esclerosis Sistémica Limitada.
- Criterios de exclusión
 - Registro de pacientes sin consentimiento informado.
 - Registro de pacientes con muestras faltantes.
 - Presencia de enfermedades infecciosas o que conlleven procesos inflamatorios.

3.2 Hipótesis, variables e indicadores

3.2.1 Hipótesis

La proteína MCP4 debido a su papel en la inflamación, migración celular y fibrosis en la ES puede desempeñar un papel fundamental como biomarcador de diagnóstico en esta enfermedad. Se postula que la estabilidad de MCP4 en su detección sérica, independientemente del tratamiento administrado al paciente, podría permitir una identificación temprana y precisa, lo que, a su vez, mejoraría significativamente el manejo clínico de la ES, contribuyendo así a una mejor atención de los pacientes con esta patología.

3.2.2 Variables

Para este estudio se hace uso de la base de datos de pacientes del CREA consignados en su consulta de reumatología como fuente de información sobre su historia clínica la cual tuvo protección de modificación, donde todos los pacientes se encontraban anonimizados a través de codificación. Para poder realizar el análisis adecuado, allí se almacenan los diferentes factores que implican el desarrollo de su enfermedad y de su estado actual todo esto bajo el consentimiento informado. Las variables para evaluar serán:

- Variables sociodemográficas: la edad, el género, duración de la enfermedad, nivel de educación, estrato socioeconómico, índice de masa corporal e edad de inicio de la enfermedad.
- Variables clínicas asociadas: Hipertensión arterial, enfermedad cerebrovascular, dislipidemia, enfermedad arterial periférica, diabetes mellitus, neoplasia, trombosis, osteoporosis, fibromialgias, enfermedades cardiovasculares, trastornos ácido-pépticos, enfermedades renales.
- Variables clínicas ES ACR/ EULAR 2013: En pacientes con ES se evaluarán criterios de ACR/EULAR 2013 (tabla 3), asociación con otras EA, síntomas clínicos asociados al progreso de la enfermedad, tratamiento, tipo de tratamiento y tiempo de uso del tratamiento.

3.2.3 Indicadores

- Niveles séricos de MCP4
- Correlación de parámetros clínicos y nivel sérico de MCP4
- Comparación con otros biomarcadores propuestos para ES

3.3 Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la proteína MCP4 como biomarcador de diagnóstico en la Esclerosis Sistémica.

Objetivos específicos

- Determinar el estado sociodemográfico y clínico de los pacientes con Esclerosis Sistémica.
- Identificar la proteína MCP4 en suero de pacientes con Esclerosis sistémica.
- Describir el rol de la proteína MCP4 en la fisiopatología de la Esclerosis Sistémica.

3.4 Técnicas y procedimientos

3.4.1 Obtención de las muestras

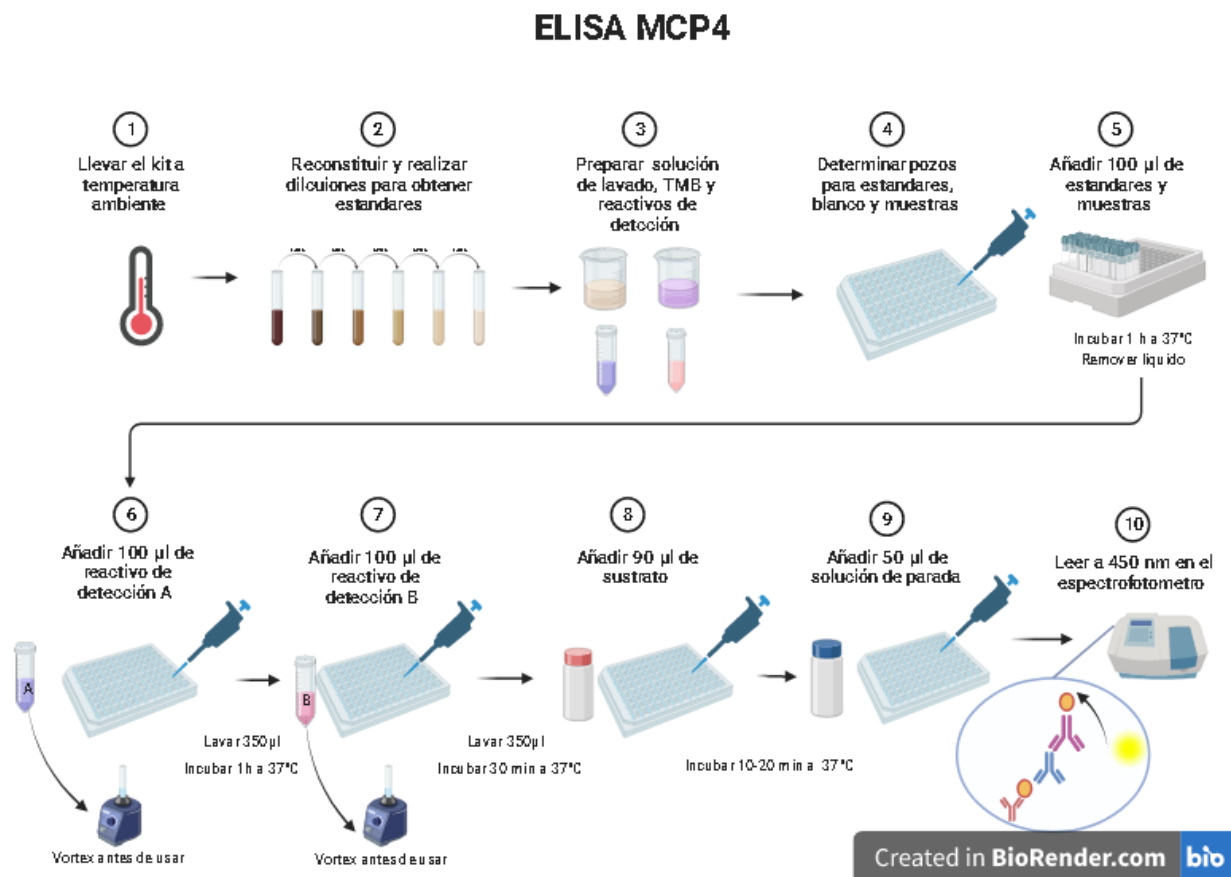
Las muestras de suero fueron obtenidas por medio de la técnica de venopunción, los cuales fueron recolectadas en tubos EDTA y fueron trasladadas al laboratorio del CREA en condiciones apropiadas, fueron procesadas mediante centrifugación (3500 rpm/ 10 min) para obtener la alícuota de estos, la cual se almaceno bajo condiciones de esterilidad y a -80°C.

3.4.2 Evaluación de la proteína MCP4 en suero

Los niveles séricos de MCP4 se midieron mediante el enzimoimmunoanálisis de adsorción en sándwich (ELISA) con el kit comercial para la proteína quimio táctica de monocitos 4 (MCP4) de la casa comercial MybioSource, este incluye una placa de 96 pocillos recubierta, diluyente, reactivos de detección, sustrato, solución de parada, tampón de lavado. Siendo el kit comercial una herramienta que facilita y agiliza el ensayo, obteniendo resultados en poco tiempo, el ensayo se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante (figura 9). Este kit tiene un rango de detección de 15,6-1.000 pg/ml y una sensibilidad de 5,8 pg/ml, los controles fueron montados por duplicado. La precisión intraensayo del kit tiene un coeficiente de variación menor al 10%, la variación entre los análisis recurrentes de las muestras indica una buena precisión de la técnica. De la misma forma, su precisión interensayo tiene un coeficiente de

variación menor al 12%, la variación entre las mediciones de las muestras en diferentes placas y momentos es baja, lo cual permite reproducibilidad y confianza en los resultados.

Figura 9. Representación esquemática de Elisa tipo Sandwich para detectar MCP4.



Nota. Creación propia.

3.4.3 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los datos sociodemográficos, comorbilidades, estado clínico y tratamiento de 36 pacientes con ES, así como de la concentración de MCP4 en pacientes y controles. Recolectando datos sobre edad, sexo, nivel educativo, actividad laboral, comorbilidades y estado clínico (poliautoinmunidad y criterios ACR/EULAR 2013) de los 36 pacientes. Se calculó el promedio de cada variable para determinar la prevalencia en los diferentes ítems.

Tal como lo indica el kit de ELISA MCP4 de la casa comercial Mybiosource, para determinar la concentración de la proteína en cada muestra, se debe generar una curva estándar la cual es necesaria para cuantificar MCP4. Para identificar en las muestras del estudio, se genera a partir de las absorbancias obtenidas de los estándares (X) y concentraciones de los estándares (Y). La gráfica de regresión lineal ($R=1$) permite el ajuste de los puntos y una ecuación que permite hallar las concentraciones de la proteína MCP4 en las muestras, de estas, se genera una curva ROC con el software XLSTAT determinando así el porcentaje de pacientes con ES que expresan la proteína. Posteriormente, se genera una tabla con diferentes puntos de corte que permite identificar y tomar una decisión sobre el umbral de detección de la proteína MCP4, esto valorando la sensibilidad y especificidad de estos valores (Figura 13) (Tabla 11).

Mediante una Mann Whitney se compararon las medias de la concentración de MCP4 entre el grupo de pacientes y el grupo de controles, para estudiar en qué grupo los valores de MCP4 son más altos o si se mantienen iguales.

4. RESULTADOS

4.1 Estado sociodemográfico de pacientes con Esclerosis Sistémica

Todos los resultados fueron apareados con los controles. La edad promedio de los pacientes con ES fue de 57 años, con una desviación estándar de 11.8 años. Esto indica que la mayoría de los pacientes se encuentran en la etapa adulta tardía, lo que coincide con la literatura que reporta una mayor incidencia de la enfermedad en este grupo etario. En cuanto al sexo, se obtuvo de los pacientes con ES predominan las mujeres (97.2%). En su nivel educativo prevaleció un tiempo de 9 años o más de estudios (61.1%), este hallazgo sugiere que la ES no está necesariamente asociada a un bajo nivel educativo, se evaluó el índice de masa corporal el cual tenía una media de 23.9, el inicio de la enfermedad tenía una media de 46 años y el estrato socioeconómico más prevalente entre los pacientes, el cual fue el 3 (38.9%).

Tabla 9. Estado sociodemográfico de pacientes con Esclerosis Sistémica

Parámetros (%)	Resultados (n=36)
Edad (Media (DE) - IQR)	57 años (12) (50-63)
Sexo	Mujeres (97,2%) Hombres (2,8%)
Nivel Educativo	9 años o más (61,1%) Menos de 9 años (38,8%)
Estrato socioeconómico	1 (8,3%) 2 (22,2%) 3 (38,9%) 4 (19,4%) 5 (5,6%) NA (5,6%)
Índice de masa corporal (Mediana-IQR)	23.9 (20.5 - 28.4)
Inicio de la enfermedad (Mediana-IQR)	46 (37,5 – 51,3)

Nota. Creación propia.

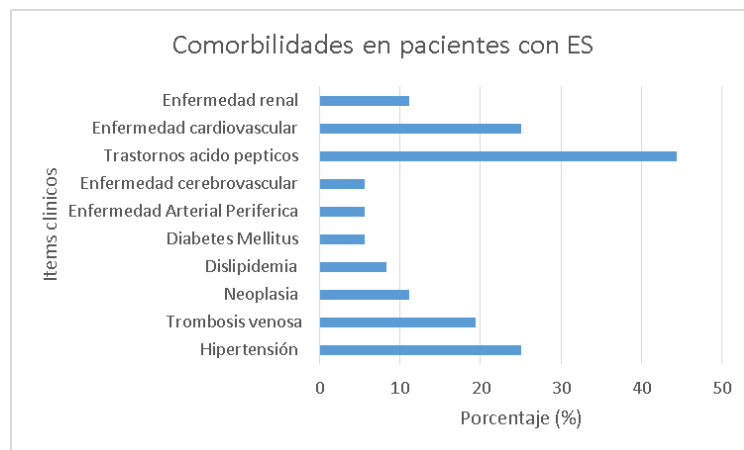
4.2 Estado clínico de pacientes con Esclerosis Sistémica

4.2.1 Comorbilidades

El estudio reveló que las comorbilidades más frecuentes en pacientes con ES son los trastornos ácido-pépticos (44,4%), la hipertensión arterial (25%), enfermedad cardiovascular (25%) y la trombosis venosa (19,4%). Otras comorbilidades relevantes incluyen, enfermedad renal (11,1%), neoplasia (11,1%), dislipidemia (8,3%) y enfermedad cerebrovascular, enfermedad arterial periférica, diabetes mellitus e Hipertensión (5,6% cada una). Fue relevante considerar en el análisis del tratamiento que estaban recibiendo los pacientes en

el curso de la ES, esto para evaluar la estabilidad de la proteína a estudiar, donde se determinó que el 77,7% de los individuos en estudio se encontraban en tratamiento y dentro del tipo de tratamiento que estaban recibiendo como corticoides, antipalúdicos, inmunosupresores y fármacos antirreumáticos, se destacó el uso de fármacos antirreumáticos (66,6%).

Figura 10. Comorbilidades estudiadas en pacientes con Esclerosis Sistémica en estudio.

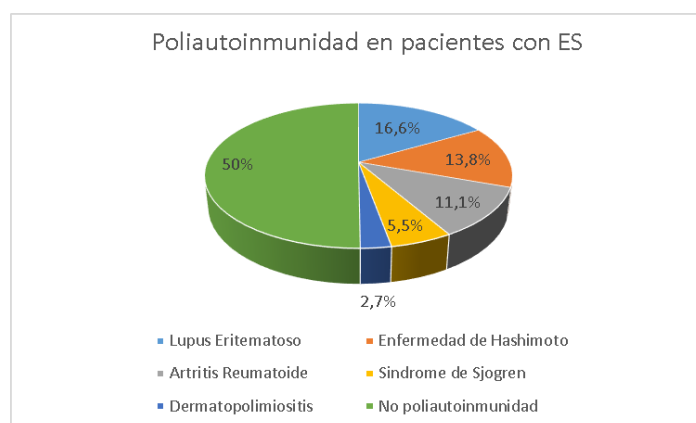


Nota. Creación propia.

4.2.2 Poliautoinmunidad

Se observó que los pacientes con ES en estudio presentaban poliautoinmunidad (50%) con enfermedades como LES, AR, dermatopolimiositis, enfermedad de Hashimoto, SS, a nivel mundial se estima que entre un 10% y un 43.9% de los pacientes con ES presentan asociada poliautoinmunidad y del mismo modo.

Figura 11. Poliautoinmunidad en pacientes con Esclerosis Sistémica en estudio.



Nota. Creación propia.

4.2.3 Criterios ACR/EULAR 2013

Se evaluaron los ítems de la ACR/EULAR 2013 para ES en los pacientes del estudio, evidenciando la prevalencia que tenían los pacientes en cada una de estas manifestaciones. Donde se obtuvo ítems que eran frecuentes. El 72% de los pacientes con ES muestran un engrosamiento en la piel de los dedos y el 94.4% de ellos presentan telangiectasias y Fenómeno de Raynaud. Igualmente, fue relevante la positividad de los autoanticuerpos anti-centrómero (55.6%) siendo estos vinculados con la ES limitada, teniendo en cuenta el desarrollo heterogéneo de la enfermedad en quienes padecen la enfermedad.

Tabla 10. Presentación de criterios de EULAR/ACR 2013 en pacientes.

Ítem	Sub- ítem (n=36) (%)	Resultado (n=36) (%)
1. Engrosamiento de la piel Con extensión a la región MCP.	-	12 (33,3)
2. Engrosamiento de la piel de los dedos.	- Dedos hinchados 5 (13,8) - Esclerodactilia 30 (83,3)	26 (72,2)
3. Lesiones en la yema de los dedos	- Ulceras digitales 3 (8,3) - Cicatrices 9 (25)	9 (25)
4. Telangiectasias	-	34 (94,4)
5. Capilares ungueales anormales	-	9 (25)

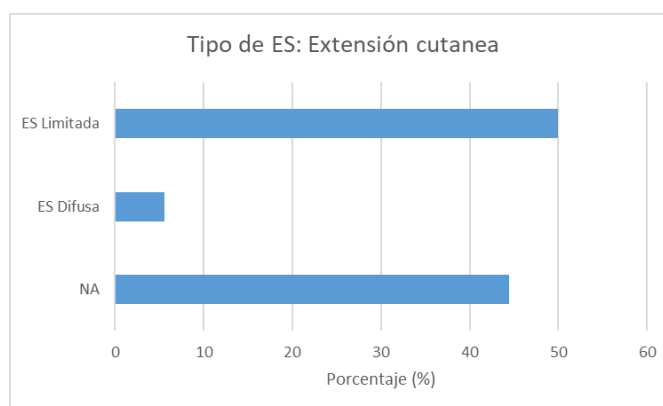
6. Hipertensión arterial pulmonar y/o enfermedad pulmonar intersticial	-	10 (27,7)
		8 (22,2)
7. Fenómeno de Raynaud	-	34 (94,4)
8. Autoanticuerpos para ES	- Anticentrómero (ACA)	20 (55,6)
	- Anti-topoisomerasa I (ATA)	2 (5,6)
	- Anti-RNA polimerasa III	0
	- NA	

Nota. Creación propia.

4.2.4 Tipo de Esclerosis Sistémica según su extensión cutánea

La extensión cutánea en la ES se puede clasificar como difusa o limitada. Basando este hallazgo con la historia clínica de los pacientes se identificó que el 50% de los pacientes han sido clasificados con una ES limitada, el 5.6% han sido clasificados con ES difusa y el 44.4% no tiene disponible esta información. Figura 12.

Figura 12. Clasificación de Esclerosis Sistémica según la extensión cutánea de los pacientes en estudio.



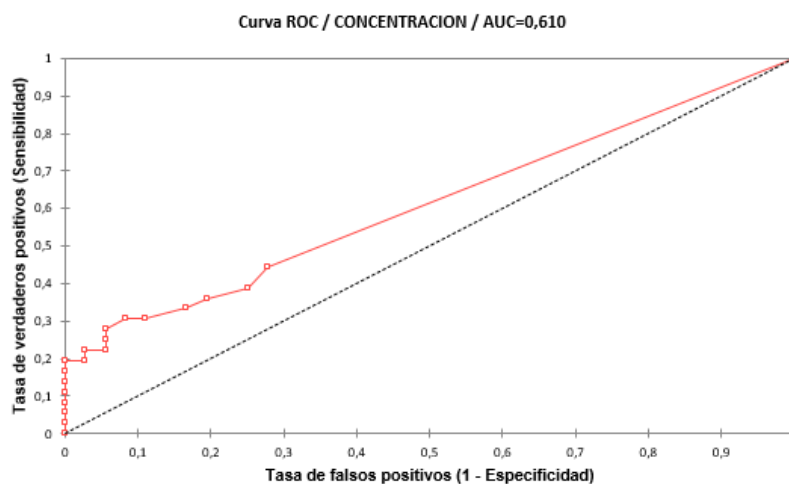
Nota. Creación propia.

4.3 Identificación de la proteína MCP4 en pacientes con Esclerosis Sistémica

4.3.1 Curva ROC y umbral de detección de la proteína MCP4

A partir de las concentraciones obtenidas en el inmunoensayo de detección ELISA con las muestras de suero de los pacientes, se generó una curva ROC con el software XLSTAT la cual permite discriminar la capacidad del ensayo para discriminar entre pacientes que expresan la proteína MCP4 y controles analizando la sensibilidad (la proporción de pacientes con esclerosis sistémica que se clasifican correctamente) y la especificidad (la proporción de pacientes sanos que se clasifican correctamente) en diferentes puntos de corte, esto calculando el valor del área bajo la curva ROC (AUC) (Figura13).

Figura 13. Curva ROC del ensayo.



Nota. Creación propia.

El valor de AUC que se obtuvo en la gráfica de las concentraciones de pacientes y controles fue de 0.610, lo cual indica que el modelo tiene una capacidad moderada para discriminar entre pacientes con ES y el grupo control, teniendo el 61% de probabilidad de clasificar correctamente a un paciente con ES que expresa MCP4.

Tabla 11. Tabla de análisis umbral de detección de la proteína MCP4.

Concentración	Sensibilidad	Especificidad	VP	VN	FP	FN	Sensibilidad + Especificidad	Precisión
0,000	1,000	0,000	36	0	36	0	1,000	0,500
2,451	0,389	0,750	14	27	9	22	1,139	0,569
6,230	0,333	0,833	12	30	6	24	1,167	0,583
8,742	0,306	0,917	11	33	3	25	1,222	0,611
11,248	0,278	0,944	10	34	2	26	1,222	0,611
14,998	0,222	0,944	8	34	2	28	1,167	0,583
19,978	0,194	0,972	7	35	1	29	1,167	0,583
32,332	0,167	1,000	6	36	0	30	1,167	0,583

Nota. VP verdaderos positivos, VN verdaderos negativos, FP falsos positivos, FN falsos negativos. Creación propia.

Al evaluar en esta curva la sensibilidad y la especificidad en diferentes puntos de corte (Tabla 11), permite determinar cuál será el umbral de detección de la proteína para el estudio, teniendo en cuenta que el valor establecido debe tener mayor porcentaje de especificidad que de sensibilidad lo que permite evitar la clasificación errónea de pacientes con ES que no expresan MCP4. Para el estudio se eligió el umbral de 8,742 y 11,248 pg/ml los cuales tenían los valores más altos sensibilidad, especificidad y precisión, dados estos valores se determinó manejar como umbral de detección en el ensayo un rango de 8,742- 11,248 pg/ml, valores que permiten determinar con la mejor precisión entre verdaderos positivos y verdaderos negativos en pacientes que sobre expresan la proteína MCP4.

4.3.2 Prueba Mann Whitney

En este estudio se realizó una prueba de Mann-Whitney para comparar el grupo de pacientes con ES y el grupo de individuos sanos con tamaños de muestra iguales (n=36 cada uno). La mediana del grupo con ES fue de 1.878, mientras que la mediana del grupo de individuos sanos fue de 0.000. La suma de rangos para los grupos A y B fueron 1471 y 1157, respectivamente. El valor U de Mann-Whitney calculado fue 491. La prueba de dos colas arrojó un valor p no significativo (ns), indicando que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de los dos grupos ($P < 0.05$). La diferencia real entre las medianas fue de -1.878. (Tabla 12) (Figura 14).

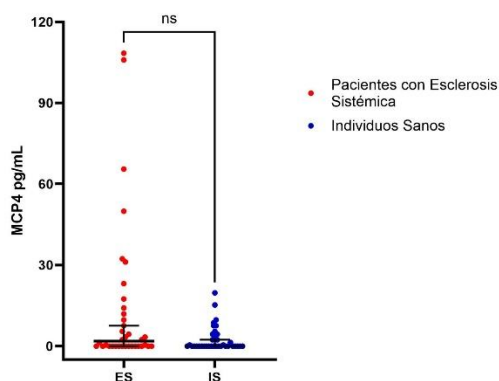
Tabla 12. Valores prueba Mann Whitney.

Item	Valor
Valor P	0.07 ns
Suma de rangos	1471, 1157
Mann Whitney	491
Diferencia de medias en ES	1.878

Nota. Creación propia.

Figura 14. Grafica de concentraciones de MCP-4 en el grupo de Esclerosis sistémica e individuos sanos.

Evaluación de la concentración de la proteína MCP4 en pacientes con esclerosis sistémica vs individuos sanos



Nota. Creación propia.

4.4 Rol de la proteína MCP4 en la Esclerosis Sistémica

A partir del umbral de detección de la proteína MCP4 se tomó a los pacientes en los cuales la concentración de la proteína era mayor al valor de corte (>11,248), 10 pacientes y 2 controles superaban este valor, clasificándolos como quienes sobre expresaban la proteína MCP4. De este grupo se analizó los parámetros antes mencionados (características sociodemográficas, comorbilidades asociadas, poliautoinmunidad, tratamiento, criterios ACR/EULAR 2013, exposición a compuestos químicos) para poder determinar la función de la proteína MCP4 en la ES y su importancia como candidata a biomarcador de diagnóstico en la enfermedad

4.4.1 Características sociodemográficas

Dentro de las características fue importante determinar nuevamente su edad y su género, observando que como la población en general con ES su edad promedio fue de 57 años y predominaba el sexo femenino (90%) con respecto al masculino (10%) (Tabla 13).

Tabla 13. Características sociodemográficas de pacientes que expresan MCP4.

Parámetros (%)	Resultados (n=10)
Promedio de edad	57 años
Sexo	Mujeres (90%) Hombres (10%)
Nivel Educacional	9 años o más (90%) Menos de 9 años (10%)
Indice de masa corporal (Mediana-IQR)	23.9 (20.5 - 28.4)

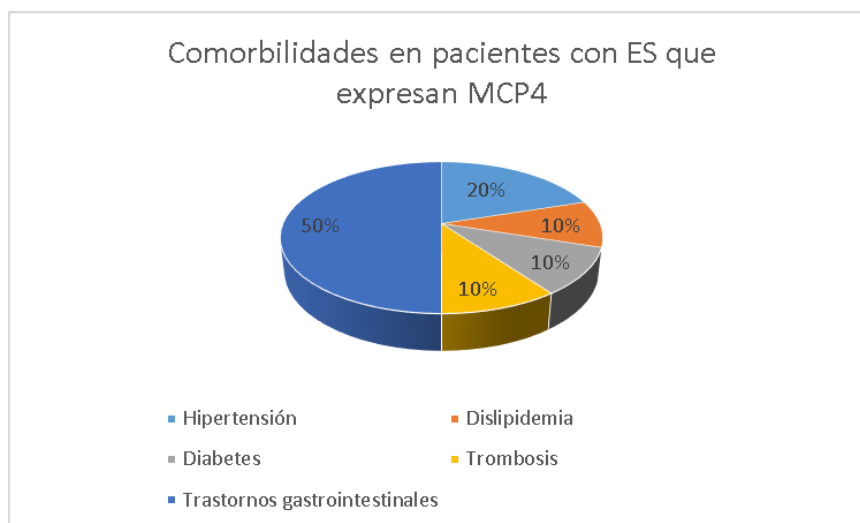
Inicio de la enfermedad (Mediana-IQR)	46 (37,5 – 51,3)
--	------------------

Nota. Creación propia.

4.4.2 Comorbilidades asociadas, poliautoinmunidad y tratamiento

En este grupo de pacientes se evaluó el diagnóstico de trastornos gastrointestinales, Diabetes Mellitus, dislipidemia, trombosis e hipertensión, de allí se constató que en estos pacientes prevalecían los trastornos gastrointestinales (50%) y la hipertensión (20%) (Figura 16).

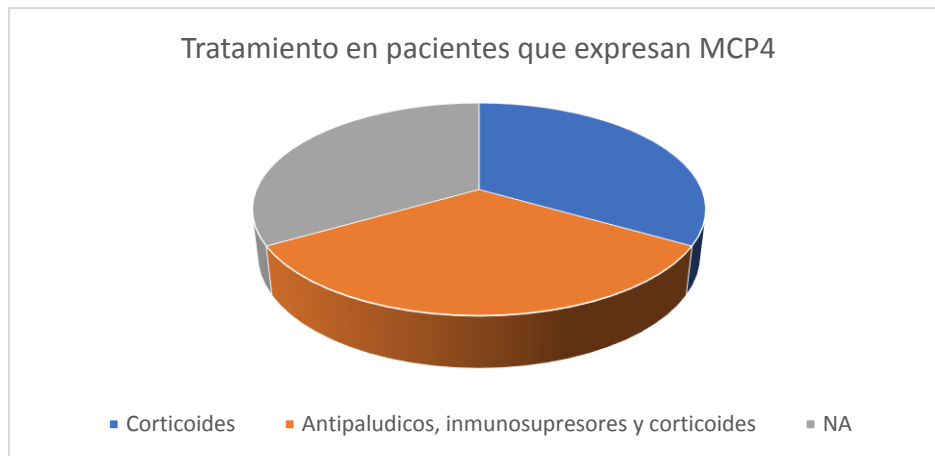
Figura 15. Comorbilidades presentadas en pacientes que expresan MCP4.



Nota. Creación propia.

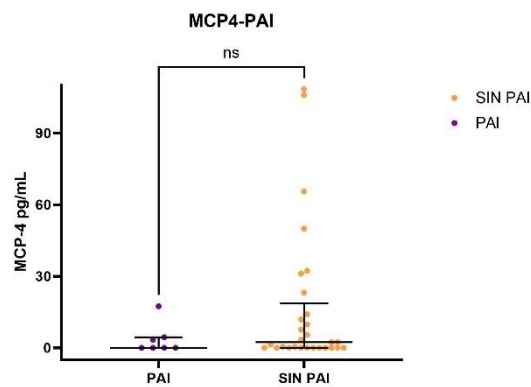
La poliautoinmunidad en este grupo de pacientes mostro que no hay un valor sobresaliente de pacientes que presenten poliautoinmunidad (20%). Se revisó de igual forma, si estos pacientes cursaban con tratamiento, se observó que gran parte (70%) estaba cursando con tratamiento durante el ensayo, mostrando la estabilidad de la proteína MCP4, de manera que, los niveles elevados de MCP-4 pueden indicar que la enfermedad está activa, incluso si los síntomas están controlados (Figura 16). Se evaluó la concentración de MCP4 con respecto a los pacientes que presentaban y no presentaban poliautoinmunidad, encontrando que los cambios en la concentracion no diferian entre estos dos grupos (Figura 17).

Figura 16. Grafica tratamiento en pacientes que expresan MCP4 .



Nota. Creación propia.

Figura 17. Concentración MCP4 y poliautoinmunidad.



Nota. Creación propia.

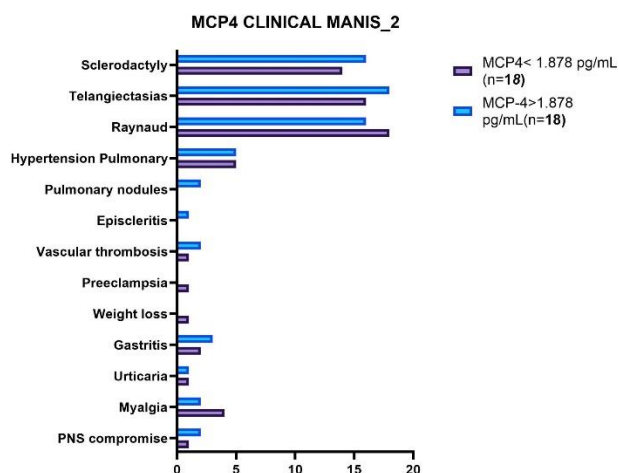
Al evaluar los criterios ACR/EULAR 2013 se corroboró que todos los pacientes que tenían niveles elevados de concentración de la proteína MCP4 presentaban telangiectasias y fenómeno de Raynaud, asociando de manera estrecha la presencia de la proteína MCP4 con daños vasculares y lesiones de la reperusión sanguínea.

Tabla 14. Criterios ACR/EULAR en pacientes que expresan MCP4.

Ítem	Sub-ítem (n=10) (%)	Resultado (n=36) (%)
1. Engrosamiento de la piel con extensión a la región MCP.	-	3 (30)
2. Engrosamiento de la piel de los dedos.	- Dedos hinchados 1 (10) - Esclerodactilia 9 (90)	9(90)
3.Lesiones en la yema de los dedos	- Ulceras digitales 1 (10) - Cicatrices	1 (10)
4. Telangiectasias	-	10 (100)
5. Capilares ungueales anormales	-	3 (30)
6.Hipertensión arterial pulmonar y/o enfermedad pulmonar Intersticial	-	3(30)
7. Fenómeno de Raynaud	-	10 (100)
8.Autoanticuerpos para ES	-Anticentrómero (ACA) -Anti -topoisomerasa I (ATA) -Anti-RNA polimerasa III - NA	7 (70)

Nota. Creación propia.

Figura 18. Manifestaciones clínicas en pacientes con ES.



5. DISCUSIÓN

La ES en Colombia es una enfermedad que ha sido olvidada, pero prevalece su mortalidad lo cual la hace relevante para ser estudiada. En este estudio de tipo transversal retrospectivo se puede constatar que es una enfermedad que se presenta en su mayoría en mujeres con una edad promedio de 57 años, lo cual es consistente con la literatura al mencionar que las enfermedades autoinmunes y en particular la ES predomina en el género femenino y en personas entre la quinta y sexta década de su vida. El desarrollo de la enfermedad con su triada característica de presentación conlleva a afectar diversos sistemas en el organismo, desencadenando patologías asociadas a los daños que esta va dejando a su paso, es evidente que estos pacientes no solo presentan la ES sino también con ella desarrollan enfermedades renales, vasculares, pulmonares relacionadas estrechamente, junto con esto, se destaca la presencia de poliautoinmunidad en quienes padecen de ES, un estudio realizado por la Universidad del Rosario describió la frecuencia de este fenómeno en ES y a nivel mundial oscila entre 10.9% al 43%, siendo esta una característica usual(118).

Todos los pacientes en estudio tuvieron un puntaje mayor o igual a 9 bajo los criterios ACR/EULAR 2013, lo cual los clasificaba con ES lo cual permitió un grupo determinado de pacientes junto con muestras completas para realizar el estudio, prevalecía en este grupo la ES limitada siendo esta la presentación más frecuente y de mejor pronóstico de la patología. Llama la atención, que dentro de estos criterios de clasificación no se incluye ninguno que pueda ser analizado de forma asequible y con un resultado rápido en el laboratorio clínico, por ello en este proyecto se propone el uso del inmunoensayo ELISA, el cual permite realizar un análisis sensible, específico, rápido y a bajo costo analizando una proteína sérica como lo es MCP4 que a diferencia de candidatos a biomarcadores genéticos y metabólicos no se necesita una cantidad mínima para que sean detectados, no se requieren pretratamientos ni acciones adicionales para el análisis, lo cual brinda beneficios a quien maneja la muestra y los resultados(119)

La proteína MCP4 está asociada a la inflamación, la vasculopatía y la fibrosis que se producen a lo largo de la ES. Mediante el ensayo realizado se evidenció que las concentraciones fueron más altas en pacientes que en controles, a pesar de esto esta diferencia no fue estadísticamente significativa, con un valor p de 0,077, evidenciando la presencia de MCP4 en la enfermedad pero de manera generalizada. De esta manera, los pacientes que expresaban la proteína tenían mayor prevalencia de manifestaciones clínicas características y tempranas de la enfermedad, como esclerodactilia, telangiectasias y fenómeno de Raynaud, las cuales se relacionan con la liberación de MCP4. Además de que la proteína se expresó aún cuando los pacientes se encontraban en tratamiento, lo que sugiere que esta proteína es estable para ser detectada, siendo un candidato a biomarcador ideal para seguir siendo estudiada. Dados estos resultados en los pacientes que mostraban niveles elevados de la proteína MCP4, se destacaron telangiectasias, el fenómeno de Raynaud y esclerodactilia (100%) en el grupo de estudio. Laifu li y colaboradores determinan la relación entre MCP4 y daño epitelial, el cual, está vinculado con su inducción de la expresión de moléculas de adhesión en células epiteliales, y el aumento

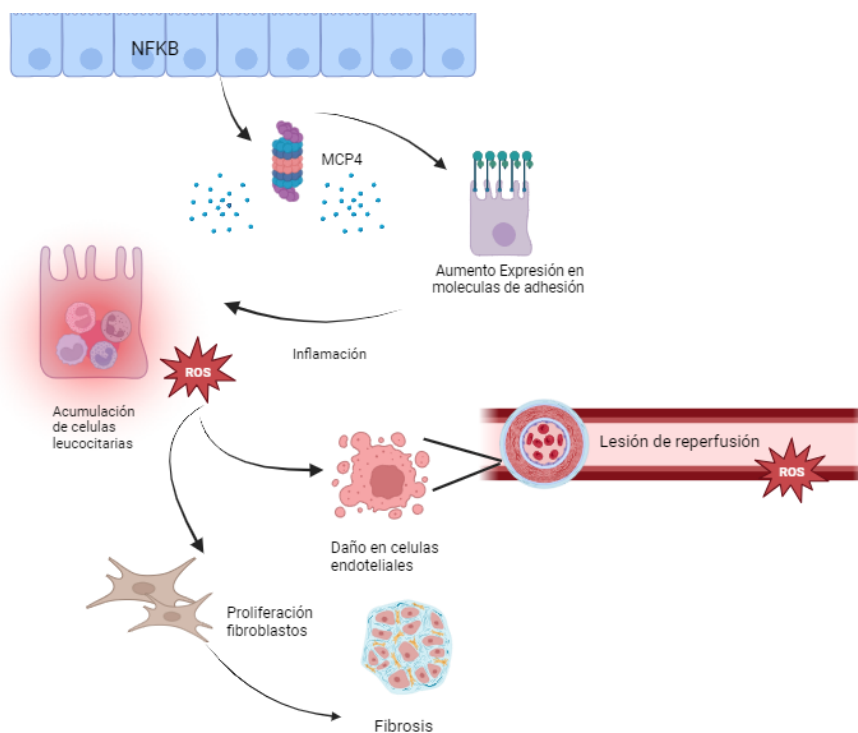
de la expresión de moléculas de adhesión, lo que supone a que más células como monocitos o neutrófilos del sistema inmunológico innato accedan al sitio de inflamación, con ellos MCP4 se libere de manera abundante, (109). Además, las telangiectasias y el fenómeno de Raynaud están asociadas a la isquemia y a lesiones de reperfusión, que es un daño endotelial generalizado en la patología. En un estudio realizado por Yanaba y colaboradores se asociaron estos mecanismos endoteliales en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son inducidas por MCP4 y generan el daño endotelial vascular, siendo también ROS inductora de la proliferación de fibroblastos implicando así su producción masiva resultando en fibrosis (31). De forma que, MCP4 en ES está implicada en la vasculopatía, fibrosis e inflamación generalizada, la cual induce a ROS.

Su mecanismo entonces, iniciaría con NFκ-B como inductor de MCP4 al sitio de inflamación aumentando así la expresión de moléculas de adhesión, lo que produce acumulación de células leucocitarias del sistema inmune innato, implicando en este punto la producción de ROS a partir de la liberación abundante de MCP4, suponiendo el daño de células endoteliales que generan lesiones de reperfusión en los vasos sanguíneos y por otro lado iniciando la proliferación de fibroblastos originando la fibrosis (Figura 18). MCP4 punto de partida de liberación de ROS (120), además siendo este un inductor a la proliferación de fibroblastos, conllevando a manifestaciones como fibrosis y daño vascular.

El estudio presento algunas limitaciones como la cantidad reducida de pacientes en estudio, lo que limita generalizar los resultados a una población más amplia, se recomienda realizar estudios con muestras más grandes para confirmar los resultados y aumentar la robustez de las conclusiones. La información disponible en las historias clínicas de algunos pacientes era incompleta y no incluía un análisis de laboratorio clínico que permitiera correlacionar la presencia de la proteína con otros parámetros, lo que pudo haber afectado la precisión de los

resultados y limita la profundización de los hallazgos, de manera que, es importante contar con historias clínicas completas, sería relevante poder realizar un estudio longitudinal de estos pacientes para comprender el comportamiento de la proteína durante el tiempo y sería pertinente estudiar la proteína junto con otros biomarcadores en estudio para aumentar la sensibilidad del estudio.

Figura 18. Rol de MCP4 en la Esclerosis Sistémica.



Nota. Creación propia.

6. CONCLUSIONES

Este estudio encontró que la proteína MCP4 podría ser un biomarcador útil para el diagnóstico y la progresión de la esclerosis sistémica esto junto con otros biomarcadores como CXCL9, CXCL10 Y CX3CL1 esto por su función generalizada en la enfermedad. La edad y genero de los pacientes en estudio se encuentra entre la cuarta y quinta decada de la vida y sus comorbilidades se asocian a la enfermedad autoinmune que padecen. El grupo de estudio con

ES no tenía niveles significativamente más altos de MCP4 que los controles, igualmente, la curva ROC determino que el ensayo podría clasificar a quienes expresaban la proteína en un 61%, igualmente, la expresión de MCP4 se asoció con manifestaciones clínicas tempranas de la ES y se detectó incluso en pacientes bajo tratamiento lo cual refleja su estabilidad para ser detectada y está relacionada a la liberación de ROS inducida por MCP4 que puede contribuir a las manifestaciones de la ES. La proteína entonces tiene como rol en la enfermedad inducir a la expresión de moléculas de adhesión, con ello, acumular células leucocitarias y contribuir en la proliferación de fibroblastos, a partir del estrés oxidativo generado en la enfermedad. Se necesitan más investigaciones para confirmar estos hallazgos y determinar la utilidad clínica de MCP4 en la ES. En futuras investigaciones se deben incluir un grupo más grande de pacientes y obtener información completa del curso de la enfermedad de los pacientes.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Jorge Mario Palmezano-Díaz, Claudia Lucía Figueroa-Pineda, Reynaldo Mauricio Rodríguez-Amaya, Lisette Katherine Plazas-Rey. Prevalence and characterization of autoimmune diseases in patients older than 13 years in a hospital of Colombia. *Medicina interna de Mexico*. 2018;34(4).
2. Abul K. Abbas AHLSP. Mecanismos de autoinmunidad . In: *Inmunología celular y molecular*. 9th ed. 2018.
3. Nicole JA, Iván GA. Inmunopatogenia de las enfermedades autoinmunes. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2012 Jul;23(4):464–72.
4. Lerner A, Jeremias P, Matthias T. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *International Journal of Celiac Disease*. 2016 May 5;3(4):151–5.
5. Londoño J, Peláez Ballestas I, Cuervo F, Angarita I, Giraldo R, Rueda JC, et al. Prevalencia de la enfermedad reumática en Colombia, según estrategia COPCORD-Asociación Colombiana de Reumatología. Estudio de prevalencia de enfermedad reumática en población colombiana mayor de 18 años. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2018 Oct;25(4):245–56.
6. Rosendahl A, Schönborn K, Krieg T. Pathophysiology of systemic sclerosis (scleroderma). *Kaohsiung J Med Sci*. 2022 Mar 2;38(3):187–95.
7. J. J. Alegre Sancho EBCICVNFLJICJARI. Esclerosis sistémica . In: *Enfermedades reumáticas: Actualización SVR*. Valencia: Hospital Universitario Dr. Peset;
8. Jerjen R, Nikpour M, Krieg T, Denton CP, Saracino AM. Systemic sclerosis in adults. Part I: Clinical features and pathogenesis. *J Am Acad Dermatol*. 2022 Nov;87(5):937–54.
9. Bobeica C, Niculet E, Halip A, Gheuca-Solovastru L, Draganescu M, Popescu I, et al. Predictive value of immunological markers in systemic sclerosis. *Exp Ther Med*. 2021 Jul 14;22(3):994.
10. Furue M, Mitoma C, Mitoma H, Tsuji G, Chiba T, Nakahara T, et al. Pathogenesis of systemic sclerosis—current concept and emerging treatments. *Immunol Res*. 2017 Aug 9;65(4):790–7.
11. Sandra S. Arango V. Biomarkers for the evaluation of human health risks. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 2012;
12. Coffey C, Radwan Y, Sandhu A, Crowson CS, Bauer P, Matteson E, et al. POS0838 EPIDEMIOLOGY AND TRENDS IN SURVIVAL OF SYSTEMIC SCLEROSIS IN OLMSTED COUNTY: A POPULATION-BASED STUDY (1980-2018). *Ann Rheum Dis*. 2021 Jun 19;80(Suppl 1):673.1-673.
13. MANNO RL, WIGLEY FM, GELBER AC, HUMMERS LK. Late-age Onset Systemic Sclerosis. *J Rheumatol*. 2011 Jul;38(7):1317–25.
14. Bergamasco A, Hartmann N, Wallace L, Verpillat P. <p>Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease</p>. *Clin Epidemiol*. 2019 Apr;Volume 11:257–73.
15. The Lancet. Reducing the cost of rare disease drugs. *The Lancet*. 2015 Feb;385(9970):746.

16. MinSalud. Resolución 023 de 2023- Enfermedades huérfanas. Ministerio de Salud y Protección Social, 023 Colombia; Jan 4, 2023.
17. Ministerio de salud. Enfermedades huérfanas. 2023 Jan.
18. Castro S V, Jimenez SA. Biomarkers in systemic sclerosis. *Biomark Med.* 2010 Feb;4(1):133–47.
19. Arron JR. Biomarkers in systemic sclerosis: mechanistic insights into pathogenesis and treatment. *Curr Opin Rheumatol.* 2021 Nov;33(6):480–5.
20. Hasegawa M, Sato S, Echigo T, Hamaguchi Y, Yasui M, Takehara K. Up regulated expression of fractalkine/CX3CL1 and CX 3CR1 in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(1).
21. O'Brien JC, Rainwater YB, Malviya N, Cyrus N, Auer-Hackenberg L, Hynan LS, et al. Transcriptional and Cytokine Profiles Identify CXCL9 as a Biomarker of Disease Activity in Morphea. *Journal of Investigative Dermatology.* 2017 Aug;137(8):1663–70.
22. Li L, Dai F, Wang L, Sun Y, Mei L, Ran Y, et al. CCL13 and human diseases. *Front Immunol.* 2023 Apr 19;14.
23. LAMKHIOUED B, GARCIA-ZEPEDA EA, ABI-YOUNES S, NAKAMURA H, JEDRZKIEWICZ S, WAGNER L, et al. Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-4 Expression in the Airways of Patients with Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Aug 1;162(2):723–32.
24. Iwamoto T, Okamoto H, Iikuni N, Takeuchi M, Toyama Y, Tomatsu T, et al. Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 is highly expressed in cartilage from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2006 Apr;45(4):421–4.
25. Truchetet ME, Brembilla NC, Chizzolini C. Current Concepts on the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2021 Sep 6;64(3):262–83.
26. Unidad de enfermedades autoinmunes: experiencia de un centro. *Revista Uruguaya de Medicina Interna.* 2020 Oct 10;05(03).
27. Arnett FC. HLA and Autoimmunity in Scleroderma (Systemic Sclerosis). *Int Rev Immunol.* 1995 Jan 10;12(2–4):107–28.
28. Diot E. Systemic sclerosis and occupational risk factors: a case-control study. *Occup Environ Med.* 2002 Aug 1;59(8):545–9.
29. Garabrant DH. Scleroderma and Solvent Exposure among Women. *Am J Epidemiol.* 2003 Mar 15;157(6):493–500.
30. Olink [Internet]. 2023. Proximity Extension Assay (PEA) technology.
31. Yanaba K, Yoshizaki A, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Shimizu K, et al. CCL13 is a promising diagnostic marker for systemic sclerosis. *British Journal of Dermatology.* 2010;162(2).
32. Gabrielli A, Avvedimento E V, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med.* 2009 May 7;360(19):1989–2003.
33. Mónica Ferrer Gracia, Laura María Cuadra Giménez, María de las Mercedes Díez Angulo, Alaitz Saiz Ferrer, María Sanmartín Xifré, Raúl Fernández Peñarroya. Esclerodermia: aspectos conceptuales, epidemiológicos, etiopatogénicos y clínicos. Artículo monográfico. *Revista sanitaria de Investigación.* 2021;

34. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeón CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: Systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2014 Oct;44(2):208–19.
35. Fernández-Ávila DG, Bernal-Macías S, Gutiérrez JM, Rincón DN, Rosselli D. Prevalence of systemic sclerosis in Colombia: Data from the National Health Registry 2012–2016. *J Scleroderma Relat Disord*. 2020 Jun 19;5(2):137–42.
36. Varga J, Trojanowska M, Kuwana M. Pathogenesis of systemic sclerosis: recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Scleroderma Relat Disord*. 2017 Sep 19;2(3):137–52.
37. Ruiz Gutiérrez L, Pérez Gómez A. Protocolo diagnóstico del fenómeno de Raynaud. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2013;11(32):1997–2000.
38. Choi E, Henkin S. Raynaud’s phenomenon and related vasospastic disorders. *Vascular Medicine*. 2021 Feb 10;26(1):56–70.
39. Thulesius O. Methods for the evaluation of peripheral vascular function in the upper extremities. *Acta Chir Scand Suppl*. 1976;465:53–4.
40. Olga Lidia Vera Lastra. Esclerosis sistémica. *Medicina Interna de México*. 2006 May;22(3).
41. Shapiro SC, Wigley FM. Treating Raynaud phenomenon: Beyond staying warm. *Cleve Clin J Med*. 2017 Oct;84(10):797–804.
42. Consejo general de colegios oficiales de farmaceuticos. *ESCLEROSIS SISTÉMICA (ESCLERODERMIA)*. Punto farmacologico . 2017;
43. Khanna D, Furst DE, Clements PJ, Allanore Y, Baron M, Czirjak L, et al. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord*. 2017;2(1):11–8.
44. Aspe Unanue L, González Hermosa MR, Gardeazabal García J. Esclerodermia (esclerosis sistémica). *Piel*. 2010 May;25(5):252–66.
45. Herrick AL, Assassi S, Denton CP. Skin involvement in early diffuse cutaneous systemic sclerosis: an unmet clinical need. *Nat Rev Rheumatol*. 2022 May 15;18(5):276–85.
46. Jiménez-Gallo D, Ossorio-García L, Linares-Barrios M. Calcinosis cutis y calcifilaxis. *Actas Dermosifiliogr*. 2015 Dec;106(10):785–94.
47. Wilkinson JM, Halland M. Esophageal Motility Disorders. *Am Fam Physician*. 2020 Sep 1;102(5):291–6.
48. Centros para el control y prevencion de enfermedades. *Información sobre la telangiectasia hemorrágica hereditaria*. 2013.
49. Janosik DL, Osborn TG, Moore TL, Shah DG, Kenney RG, Zuckner J. Heart disease in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum*. 1989 Dec;19(3):191–200.
50. Steen VD. Kidney involvement in systemic sclerosis. *Presse Med*. 2014 Oct;43(10):e305–14.
51. Lock G, Holstege A, Lang B, Schölmerich J. Gastrointestinal manifestations of progressive systemic sclerosis. *Am J Gastroenterol*. 1997 May;92(5):763–71.
52. Azarbani N, Javadzadeh A, Mohseni I, Jalali A, Andalib E, Poormoghim H. Association of Musculoskeletal and Radiological Features with Clinical and

- Serological Findings in Systemic Sclerosis: A Single-Centre Registry Study. *Mediterr J Rheumatol.* 2020;31(3):341.
53. Paloma García de la Peña Lefebvre. Esclerosis sistémica. *Sociedad Española de Reumatología Pediátrica* . 2020;173–85.
54. Sobolewski P, Maślińska M, Wieczorek M, Łagun Z, Malewska A, Roszkiewicz M, et al. Systemic sclerosis – multidisciplinary disease: clinical features and treatment. *Rheumatology.* 2019 Sep 24;57(4):221–33.
55. De Pieri A, Korman BD, Jünger A, Wuertz-Kozak K. Engineering Advanced In Vitro Models of Systemic Sclerosis for Drug Discovery and Development. *Adv Biol.* 2021 Apr 15;5(4).
56. Marie I, Gehanno JF. Environmental risk factors of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2015 Sep 4;37(5):463–73.
57. Luo Y, Wang Y, Wang Q, Xiao R, Lu Q. Systemic sclerosis: Genetics and epigenetics. *J Autoimmun.* 2013 Mar;41:161–7.
58. Ouchene L, Muntyanu A, Lavoué J, Baron M, Litvinov I V., Netchiporouk E. Toward Understanding of Environmental Risk Factors in Systemic Sclerosis. *J Cutan Med Surg.* 2021 Mar 28;25(2):188–204.
59. DENTON CP, BICKERSTAFF MCM, SHIWEN X, CARULLI MT, HASKARD DO, DUBOIS RM, et al. SERIAL CIRCULATING ADHESION MOLECULE LEVELS REFLECT DISEASE SEVERITY IN SYSTEMIC SCLEROSIS. *Rheumatology.* 1995;34(11):1048–54.
60. Bagabir RA, Syed F, Rautemaa R, McGrouther DA, Paus R, Bayat A. Upregulation of Toll-Like Receptors (TLRs) 6, 7, and 8 in Keloid Scars. *Journal of Investigative Dermatology.* 2011 Oct;131(10):2128–30.
61. Bhattacharyya S, Varga J. Emerging Roles of Innate Immune Signaling and Toll-Like Receptors in Fibrosis and Systemic Sclerosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2015 Jan 22;17(1):2.
62. Tan FK, Zhou X, Mayes MD, Gourh P, Guo X, Marcum C, et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology.* 2006 Jun 1;45(6):694–702.
63. Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, Gourh P, Agarwal SK, McNearney TA, et al. Systemic sclerosis and lupus: Points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):589–98.
64. Saigusa R, Asano Y, Taniguchi T, Yamashita T, Ichimura Y, Takahashi T, et al. Multifaceted contribution of the TLR4-activated IRF5 transcription factor in systemic sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2015 Dec 8;112(49):15136–41.
65. Bossini-Castillo L, Martín JE, Díaz-Gallo LM, Rueda B, Martín J. Genética de la esclerodermia. *Reumatol Clin.* 2010 Sep;6:12–5.
66. Brkic Z, van Bon L, Cossu M, van Helden-Meeuwse CG, Vonk MC, Knaapen H, et al. The interferon type I signature is present in systemic sclerosis before overt fibrosis and might contribute to its pathogenesis through high BAFF gene expression and high collagen synthesis. *Ann Rheum Dis.* 2016 Aug;75(8):1567–73.

67. Stifano G, Christmann RB. Macrophage Involvement in Systemic Sclerosis: Do We Need More Evidence? *Curr Rheumatol Rep*. 2016 Jan 23;18(1):2.
68. Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, Wu C, Gilliam AC. Murine Sclerodermatous Graft-Versus-Host Disease, a Model for Human Scleroderma: Cutaneous Cytokines, Chemokines, and Immune Cell Activation. *The Journal of Immunology*. 2002 Mar 15;168(6):3088–98.
69. Lescoat A, Lecureur V, Roussel M, Sunnaram BL, Ballerie A, Coiffier G, et al. CD16-positive circulating monocytes and fibrotic manifestations of systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2017 Jul 14;36(7):1649–54.
70. Yamamoto T, Eckes B, Krieg T. High expression and autoinduction of monocyte chemoattractant protein-1 in scleroderma fibroblasts. *Eur J Immunol*. 2001 Oct;31(10):2936–41.
71. Chizzolini C, Boin F. The role of the acquired immune response in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015 Sep 8;37(5):519–28.
72. O'Reilly S, Huggle T, van Laar JM. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology*. 2012 Sep 1;51(9):1540–9.
73. Brown M, O'Reilly S. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2019 Feb 18;195(3):310–21.
74. Kalogerou A. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2005 Aug 1;64(8):1233–5.
75. Thoreau B, Chaigne B, Renaud A, Mouthon L. Pathophysiology of systemic sclerosis. *Presse Med*. 2021 Apr;50(1):104087.
76. Hua-Huy T, Dinh-Xuan AT. Cellular and molecular mechanisms in the pathophysiology of systemic sclerosis. *Pathologie Biologie*. 2015 Apr;63(2):61–8.
77. Asano Y. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis: An Understanding Based on a Common Pathologic Cascade across Multiple Organs and Additional Organ-Specific Pathologies. *J Clin Med*. 2020 Aug 19;9(9):2687.
78. HASEGAWA M. B lymphocytes: Shedding new light on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol*. 2010 Jan 24;37(1):3–10.
79. Yoshizaki A. Pathogenic roles of B lymphocytes in systemic sclerosis. *Immunol Lett*. 2018 Mar;195:76–82.
80. Roberts AB, Sporn MB. Physiological Actions and Clinical Applications of Transforming Growth Factor- β (TGF- β). *Growth Factors*. 1993 Jan 11;8(1):1–9.
81. Boltjes A, van Wijk F. Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation. *Front Immunol*. 2014 Apr 1;5.
82. Audiger C, Rahman MJ, Yun TJ, Tarbell K V., Lesage S. The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *The Journal of Immunology*. 2017 Mar 15;198(6):2223–31.
83. Granot T, Senda T, Carpenter DJ, Matsuoka N, Weiner J, Gordon CL, et al. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity*. 2017 Mar;46(3):504–15.
84. Carvalheiro T, Zimmermann M, Radstake TRDJ, Marut W. Novel insights into dendritic cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2020 Jun 11;201(1):25–33.

85. Shima Y. Cytokines Involved in the Pathogenesis of SSc and Problems in the Development of Anti-Cytokine Therapy. *Cells*. 2021 May 4;10(5):1104.
86. Kikuchi K, Hartl CW, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. Direct demonstration of transcriptional activation of collagen gene expression in systemic sclerosis fibroblasts: Insensitivity to TGF β 1 stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Aug;187(1):45–50.
87. Juhl P, Bondesen S, Hawkins CL, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Davies MJ, et al. Dermal fibroblasts have different extracellular matrix profiles induced by TGF- β , PDGF and IL-6 in a model for skin fibrosis. *Sci Rep*. 2020 Oct 14;10(1):17300.
88. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, et al. Significant Correlation Between Connective Tissue Growth Factor Gene Expression and Skin Sclerosis in Tissue Sections from Patients with Systemic Sclerosis. *Journal of Investigative Dermatology*. 1995 Aug;105(2):280–4.
89. Aspe Unanue L, González Hermosa MR, Gardeazabal García J. Esclerodermia (esclerosis sistémica). *Piel*. 2010 May;25(5):252–66.
90. Umehara H, Kumagai S, Ishida H, Suginoshita T, Maeda M, Imura H. Enhanced production of interleukin-2 in patients with progressive systemic sclerosis. hyperactivity of cd4-positive t cells? *Arthritis Rheum*. 1988 Mar 29;31(3):401–7.
91. Maria ATJ, Bourgier C, Martinaud C, Borie R, Rozier P, Rivière S, et al. De la fibrogenèse à la fibrose : mécanismes physiopathologiques et présentations cliniques. *Rev Med Interne*. 2020 May;41(5):325–9.
92. Pannu J, Trojanowska M. Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*. 2004 Nov;16(6):739–45.
93. Adriana Acosta Gómez. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad. *Universitas Odonto*. 2006;25(57):26–33.
94. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *WIREs Developmental Biology*. 2015 May 13;4(3):215–66.
95. Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006 Mar;2(3):134–44.
96. Damoiseaux J, Potjewijd J, Smeets RL, Bonroy C. Autoantibodies in the disease criteria for systemic sclerosis: The need for specification for optimal application. *J Transl Autoimmun*. 2022;5:100141.
97. Chen XH, Huang S, Kerr D. Biomarkers in clinical medicine. *IARC Sci Publ*. 2011;(163):303–22.
98. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum*. 2013 Nov;65(11):2737–47.
99. Anna Bazsó, Emese Kiss. The Role of Biomarkers in the Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Therapeutic Approach in Systemic Sclerosis. *Preprints (Basel)*. 2023 Aug 8;
100. Domsic RT, Medsger TA. Autoantibodies and Their Role in Scleroderma Clinical Care. *Curr Treatm Opt Rheumatol*. 2016 Sep 14;2(3):239–51.

101. Cavazzana I, Vojinovic T, Airo' P, Fredi M, Ceribelli A, Pedretti E, et al. Systemic Sclerosis-Specific Antibodies: Novel and Classical Biomarkers. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2022 Jun 18;64(3):412–30.
102. Kowal-Bielecka O, Fransén J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y, et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2017 Aug;76(8):1327–39.
103. Chen XH, Huang S, Kerr D. Biomarkers in clinical medicine. *IARC Sci Publ*. 2011;(163):303–22.
104. Chen XH, Huang S, Kerr D. Biomarkers in clinical medicine. *IARC Sci Publ*. 2011;(163):303–22.
105. Utsunomiya A, Oyama N, Hasegawa M. Potential Biomarkers in Systemic Sclerosis: A Literature Review and Update. *J Clin Med*. 2020 Oct 22;9(11):3388.
106. Utsunomiya A, Oyama N, Hasegawa M. Potential Biomarkers in Systemic Sclerosis: A Literature Review and Update. *J Clin Med*. 2020 Oct 22;9(11):3388.
107. Farmaki E, Chatzistamou I, Kiaris H. Human MCP Chemokine Cluster. In: *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 2482–9.
108. Barinka C, Prahla A, Lubkowski J. Structure of human monocyte chemoattractant protein 4 (MCP-4/CCL13). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2008 Mar 1;64(3):273–8.
109. Mendez-Enriquez E, García-Zepeda EA. The multiple faces of CCL13 in immunity and inflammation. *Inflammopharmacology*. 2013 Dec 12;21(6):397–406.
110. Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, et al. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol*. 1996 Dec 15;157(12):5613–26.
111. Li L, Dai F, Wang L, Sun Y, Mei L, Ran Y, et al. CCL13 and human diseases. *Front Immunol*. 2023 Apr 19;14.
112. Barinka C, Prahla A, Lubkowski J. Structure of human monocyte chemoattractant protein 4 (MCP-4/CCL13). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2008 Mar 1;64(3):273–8.
113. Hein H, Schlüter C, Kulke R, Christophers E, Schröder JM, Bartels J. Genomic Organization, Sequence Analysis and Transcriptional Regulation of the Human MCP-4 Chemokine Gene (SCYA13) in Dermal Fibroblasts: A Comparison to Other Eosinophilic β -Chemokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Feb;255(2):470–6.
114. Gambichler T, Yilmaz E, Höxtermann S, Kolios A, Moritz R, Bechara FG, et al. Serum CCL13 levels in patients with systemic sclerosis and controls. *British Journal of Dermatology*. 2011 Jul;165(1):216–8.
115. Petering H, Höchstetter R, Kimmig D, Smolarski R, Kapp A, Elsner J. Detection of MCP-4 in dermal fibroblasts and its activation of the respiratory burst in human eosinophils. *J Immunol*. 1998 Jan 15;160(2):555–8.
116. Li L, Dai F, Wang L, Sun Y, Mei L, Ran Y, et al. CCL13 and human diseases. *Front Immunol*. 2023 Apr 19;14.

117. Yanaba K, Yoshizaki A, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Shimizu K, et al. CCL13 is a promising diagnostic marker for systemic sclerosis. *British Journal of Dermatology*. 2010;162(2).
118. Polania Maria Daniela, Higuera Maria. FRECUENCIA DE POLIAUTOINMUNIDAD EN ESCLEROSIS SISTÉMICA. Universidad del Rosario . 2020 Jun;
119. Prince HE. Biomarkers for diagnosing and monitoring autoimmune diseases. *Biomarkers*. 2005 Jan 20;10(sup1):44–9.
120. Vona R, Giovannetti A, Gambardella L, Malorni W, Pietraforte D, Straface E. Oxidative stress in the pathogenesis of systemic scleroderma: An overview. *J Cell Mol Med*. 2018 Jul 17;22(7):3308–14.
121. Minier T, Guiducci S, Bellando-Randone S, Bruni C, Lepri G, Czirják L, et al. Preliminary analysis of the very early diagnosis of systemic sclerosis (VEDOSS) EUSTAR multicentre study: evidence for puffy fingers as a pivotal sign for suspicion of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2014;73:2087-93