



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

DETERMINACIÓN DE LEUCOTRIENOS EN LÍQUIDOS CORPORALES Y  
TEJIDO DE PACIENTES CON ESCLEROSIS SISTÉMICA

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
ANGÉLICA IRENE MANDUJANO SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS  
DR. LUIS HUMBERTO SILVEIRA TORRE  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

COMITÉ TUTOR  
DRA. MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN  
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN. UNIVERSIDAD ANÁHUAC NORTE

†DR. IGNACIO MÉNDEZ RAMÍREZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATEMÁTICAS  
APLICADAS Y EN SISTEMAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., DICIEMBRE DE 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Agradecimientos:

A todas las personas que me apoyaron durante todo el proceso. Primero que nada, al programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas y la querida universidad pública, la UNAM. A mi tutor el Dr. Luis H, Silveira Torre y al Dr. Manuel Martínez-Lavín por todo su apoyo en el departamento de Reumatología y al Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez incluyendo al Dr. Rafael Bojalil, en especial al Dr. Fausto Sánchez y la M. en C. Martha Ballinas; Dra. Lorena Gómez, Dra. Rashidi Springall, Dr. Ricardo Márquez y QFB Valentín Jiménez, por su apoyo no solo académico sino logístico para la realización de todas las pruebas y no menos importante por su amistad. Sin la colaboración de todos ellos, este proyecto no hubiera siquiera empezado. A la Dra. María Dolores Correa Beltrán de mi comité tutor por todo su apoyo, por sus enseñanzas durante todo el proceso y por todos sus valiosos comentarios que mejoraron esta investigación. Así como el soporte para el entrenamiento de los EIA y por supuesto, a su alumna Yevel Flores para la realización de los ensayos de TGF- $\beta$ 1, sin su ayuda no podrían haberse realizado. Al doctor y gran maestro Ignacio Méndez Ramírez que, aunque tristemente ya no está con nosotros me brindó todo su apoyo en el diseño, análisis estadístico y la metodología; agradezco especialmente al Maestro Chiharu Murata por todo su apoyo en la estadística y metodología en ausencia del Dr. Ignacio Méndez, su apoyo fue invaluable. Al Dr. Francisco Javier García Vázquez por todo su apoyo para la realización de la inmunocitoquímica en las muestras de fibroblastos. A todas mis pacientes y controles, generosas, que participaron desinteresadamente en este proyecto. En especial a mi hermana la Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez por todo su apoyo en todos los sentidos posibles; a la Bióloga Rosa Mancilla por todo su ayuda en el laboratorio para el cuidado de los pequeños fibroblastos y la preservación de las muestras. A Araceli Ballesteros por su apoyo en lo administrativo. Particularmente a mi familia mis padres Dra. Carmen Sánchez y Dr. Mario Mandujano, por orden de nacimiento a Melissa del Carmen y Valentina Golubov, a Camilo, Emiliano y Alejandro Mandujano. A Meli y mis hermanos Francisco y Marito; también a Ale, Anilú y Jordan. A todos ellos por existir, por sus consejos, sus opiniones críticas, por su apoyo emocional y académico, por su solidaridad, su alegría; por su compromiso y su gusto por la vida y por el conocimiento, por su apoyo incondicional e incansable y por su cosmovisión fuera de este mundo. Además, a Melissa por su excelente revisión del inglés para la publicación del artículo. A la Dra. Leonor Sánchez por el último empujón que me dio para poder culminar este proyecto. En fin, a todos aquellos que estuvieron en este largo camino aportando, apoyando, caminando conmigo. A mi nueva casa la UAM. Y a los que se me olvidan por locura, también muchas gracias.

## ÍNDICE

Carátula y firmas .....	I
Agradecimientos .....	II
Índice .....	III
Glosario .....	4
Resumen .....	5
1. Introducción .....	7
2. Planteamiento del problema .....	18
3. Justificación .....	19
4. Objetivos .....	20
4.1 Objetivo general .....	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
5. Pregunta de Investigación .....	21
6. Hipótesis .....	22
6.1 Hipótesis general .....	22
6.2 Hipótesis particular .....	22
7. Diseño y Métodos.....	22
8. Resultados.....	36
9. Discusión .....	47
10. Conclusiones .....	59
11. Perspectivas.....	60
12. Bibliografía .....	59

**GLOSARIO**

5-HPETE: ácidos 5-hidroperoxieicosatetraenoicos

5-LO: 5-lipooxigenasa

$\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -actina del músculo liso

AA: ácido araquidónico

LBA: líquido de lavado bronquioalveolar

CTGF: factor de crecimiento del tejido conjuntivo

CAE: condensado de aire espirado

EIA: ensayos inmunoenzimáticos

EPI: enfermedad pulmonar intersticial

ES: esclerosis sistémica o esclerodermia

ESD: esclerosis sistémica difusa

ESL: esclerosis sistémica limitada

FB: fibroblastos

FLAP: proteína activadora de la 5-LO

FP: fibrosis pulmonar

FPI: fibrosis pulmonar idiopática

FR: Fenómeno de Raynaud

HAP: hipertensión arterial pulmonar

TACAR: tomografía computarizada de alta resolución (high resolution tomography)

LT: leucotrienos

LTA4: leucotrieno A4

LTB4: leucotrieno B4

LTC4: leucotrieno C4

LTD4: leucotrieno D4

LTE4: leucotrieno E4

NFC: capilaroscopia ungueal

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante- $\beta$

ROS: especies reactivas de oxígeno

SMA: Actina de músculo liso

UD: úlceras digitales

## RESUMEN

La esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad autoinmune del tejido conjuntivo, caracterizada por fibrosis de la piel y de órganos internos. La patogénesis involucra la interacción de numerosos mediadores, sin embargo, los leucotrienos (LT) han recibido poca atención. Los LT son mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico e incluyen el LTA<sub>4</sub>, el LTB<sub>4</sub> y los cisteinil-leucotrienos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>), estos últimos denominados así porque contienen un residuo de cisteína. La fisiopatología de la ES es sumamente compleja, pero se caracteriza por alteraciones en la inflamación y la regulación inmune; microangiopatía y fibrosis intersticial y vascular. Los LT tienen potentes propiedades inflamatorias, vasculares y participan en las vías de la fibrosis, por lo que su actividad biológica corresponde con las principales vías patogénicas de la ES, lo que los hace de interés para el estudio en la fisiopatología de la enfermedad. El objetivo fue comparar los niveles de LT en saliva, plasma y sobrenadante de cultivos de fibroblastos (FB) entre pacientes con ES y voluntarias sanas y determinar su asociación con manifestaciones vasculares y con otras citocinas con propiedades profibróticas incluyendo la interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) que se han implicado previamente en la enfermedad. Asimismo, comparar las diferencias en la expresión de receptores de LT y otros genes blancos en FB de manera basal, pos-estimulación con LT y estimulados con suero de pacientes. **Estrategia:** Se incluyeron 20 pacientes que cumplieron los criterios de clasificación de ES (2013) y un grupo control de 16 voluntarias sanas. Se evaluaron a los individuos de manera transversal. **Métodos:** Se utilizaron ensayos inmunoenzimáticos para determinar LTB<sub>4</sub> y CysLT (Cayman Chemical, USA) en plasma y saliva; e IL-10 (Prepotech, USA) en suero. Se determinó el TGF- $\beta$ 1 sérico por citometría de flujo (BD Citometric Bread Array CBA). Se prepararon cultivos de FB de las muestras de piel; para comparar la expresión mRNA de los genes COL1A1, COL3A1, TGFB1, CTGF, CYSLTR1, CYSLTR2 y LTB1 por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-QPCR) de manera basal y tras estimulación con ionóforo, LTB<sub>4</sub> y CysLT y de FB de controles tratados con suero de pacientes y suero autólogo, se determinaron las

concentraciones de LTC4 en el sobrenadante de los FB tratados. **Resultados:** El fenómeno de Raynaud (FR) a la exploración se asoció con mayores niveles de CysLT en saliva (ES:  $129.3 \pm 24.6$  vs. Controles:  $23 \pm 22.46$ ,  $p = 0.01$ ), plasma (ES:  $87.5 \pm 11.2$  vs. Controles:  $32.3 \pm 10.7$  pg/mL,  $p = 0.002$ ) e IL-10 en suero ( $p = 0.02$ ). La pérdida de capilares estuvo asociada con mayores niveles de CysLT (ES:  $138.6 \pm 26.7$  vs.  $23 \pm 21.6$ ,  $p = 0.0007$ ) y LTB4 (ES:  $3380.9 \pm 426.6$  vs.  $1216.3 \pm 346.1$ ,  $p = 0.0005$ ) en saliva e IL-10 ( $p = 0.006$ ) y TGF- $\beta$  ( $p = 0.04$ ) en suero. El patrón tardío de esclerodermia se asoció con niveles más elevados de CysLT (ES:  $205.6 \pm 32$  vs. Controles  $23 \pm 19.6$ ,  $p = 0.0002$ ) y LTB4 ( $4564.9 \pm 503.6$  vs. Controles  $1216.3 \pm 308.3$ ,  $p < 0.0001$ ) en saliva. El grupo con capilares gigantes también mostró niveles más elevados de LTB4 ( $p = 0.001$ ) en saliva y de IL-10 ( $p = 0.007$ ) en suero. No se encontraron diferencias en la expresión de genes por RT-QPCR ni en los niveles de LTC4 en los sobrenadantes. **Conclusiones:** los niveles de LT, principalmente en saliva, se encontraron más elevados en pacientes con ES que presentaron anomalías vasculares, por lo que los LT podrían estar involucrados en su fisiopatología. La saliva mostró ser una opción útil para evaluar y estudiar a los LT en la ES. Se requieren nuevas investigaciones para determinar si los LT pudieran ser un blanco terapéutico en las manifestaciones vasculares de la ES.

## INTRODUCCIÓN

La esclerodermia o esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad del tejido conjuntivo mediada de manera autoinmune, que se caracteriza por fibrosis de la piel y de los órganos internos<sup>[1]</sup>. La fibrosis progresiva usualmente está precedida y acompañada de anomalías vasculares, inmunológicas e inflamatorias específicas<sup>[2,3]</sup>. Aunque la fibrosis excesiva es el rasgo patológico más característico, se considera que representa un rasgo tardío e irreversible de la enfermedad<sup>[1,4]</sup>. La incidencia anual mundial es de 2 a 50 casos/millón de habitantes/año con una prevalencia entre 40 a 340 casos/millón de habitantes<sup>[5,6]</sup>. Más recientemente, se ha reportado una prevalencia entre 3.1 y 144.5 por 100,000 individuos con una prevalencia combinada de 17.6% por 100,000 y una tasa de incidencia combinada de 1.4/100,000 personas/año, y de 1.6-2/100,000 personas/año en Norteamérica<sup>[7]</sup>.

Aunque los estudios de seguimiento han mostrado mejoría en la supervivencia, las tasas de mortalidad continúan siendo elevadas de tal manera que continúa siendo la enfermedad reumatológica de mayor morbilidad y mortalidad, especialmente en la variedad difusa<sup>[8-16]</sup>. En los últimos años se reportan tasas de mortalidad estandarizadas entre 1.39-5.1. El involucro de los órganos relacionados a ES ocasiona alrededor del 50% de la mortalidad aún en estudios más recientes (43-61%)<sup>[8]</sup>. La causa primaria de muerte en la ES está asociada a complicaciones cardiopulmonares específicamente la fibrosis pulmonar (FP) y la hipertensión arterial pulmonar (HAP), las cuales ocasionan más de la mitad de las muertes relacionadas a ES<sup>[17-20]</sup>, con riesgos relativos que varían entre 1.68 a 9.49<sup>[8]</sup>. Los pacientes con ambas complicaciones tienen la peor tasa de supervivencia<sup>[8]</sup> con una mortalidad a 10 años de la enfermedad pulmonar intersticial (EPI) hasta del 40% de los pacientes<sup>[6]</sup>. Más recientemente las infecciones y las enfermedades malignas se han reportado como las causas más importantes no relacionadas a ES<sup>[8]</sup>. A pesar del progreso que se ha hecho en campo, el tratamiento de la ES continúa siendo insatisfactorio debido a la baja eficacia y alta toxicidad de las terapias disponibles<sup>[17]</sup> y el progreso de fármacos modificadores de la enfermedad ha sido lento<sup>[8]</sup>.



La enfermedad predomina en el género femenino, con una relación reportada desde 4:1 hasta 14:1. Dentro de las variedades clínicas de la ES, se incluyen la forma limitada (ESL) que se caracteriza por engrosamiento de la parte distal de las extremidades, la cara y el cuello, y la forma difusa (ESD), en la que el engrosamiento cutáneo es más amplio, afectando las extremidades y el tronco<sup>[5,21]</sup>. Las manifestaciones asociadas a la ES son resultado de la pérdida de la función, principalmente por fibrosis de los diversos órganos involucrados, y la gravedad depende de la extensión de este proceso de fibrogénesis<sup>[1]</sup>.

La EPI es una complicación frecuente de la ES y ocurre hasta en el 90% de los pacientes que son evaluados con técnicas diagnósticas sensibles como la tomografía de alta resolución (TACAR). La EPI es una complicación derivada de la fibrosis que ocurre en el parénquima pulmonar y se piensa que el proceso fibrótico está influenciado por los LT. El líquido de lavado bronquioalveolar (LBA) de pacientes con ES expresa numerosos factores que pueden afectar el proceso inflamatorio y la fibrosis asociada a ES<sup>[22]</sup>.

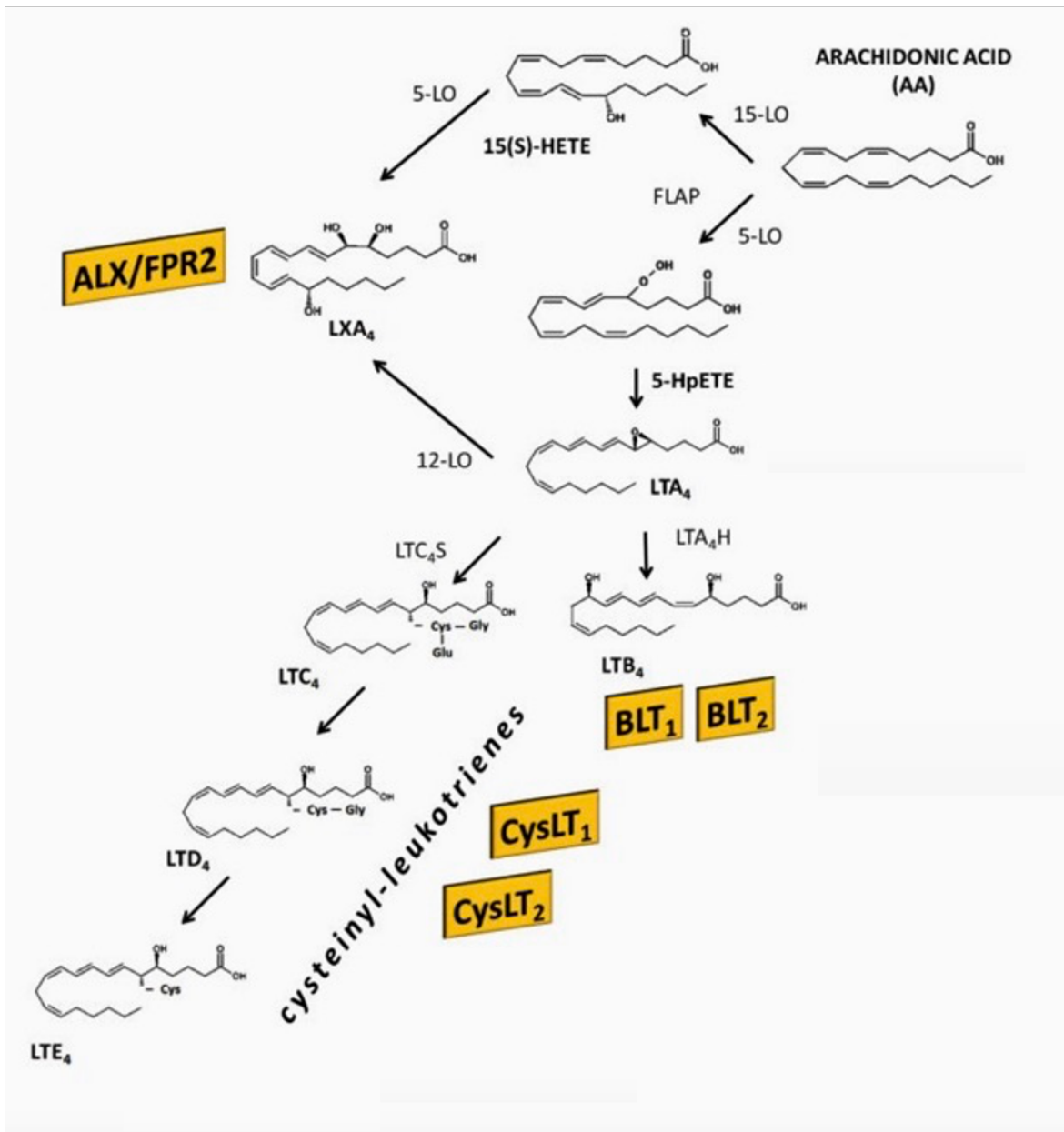
La enfermedad vascular digital (vasculopatía) se presenta prácticamente en todos los casos. El Fenómeno de Raynaud (FR) ocurre aproximadamente en el 95% de los pacientes, sin embargo, en el porcentaje restante hay evidencia de microangiopatía en la capilaroscopia<sup>[23,24]</sup>. En el FR asociado a ES ocurre isquemia tisular persistente lo que resulta en úlceras digitales (UD) o gangrena digital<sup>[23]</sup>. La serie de cambios característicos que ocurren en el episodio de FR incluyen una palidez inicial causada por la vasoconstricción de las arteriolas precapilares, seguida de una coloración azul o purpúrica que indica cianosis, por la sangre secuestrada desoxigenada y finalmente una coloración rojiza o hiperemia causada por los cambios pos-isquémicos<sup>[23]</sup>. Aproximadamente 75% de los pacientes desarrollarán su primera úlcera digital dentro de los primeros cinco años del desarrollo de otros síntomas no FR, además la vasculopatía progresiva puede progresar a isquemia crítica o gangrena lo que afecta hasta el 9% de los pacientes que pueden necesitar amputación digital. Por lo tanto, está relacionado con un incremento en la morbilidad y discapacidad asociada a la enfermedad y ocasiona altos costos relacionados al tratamiento y a la atención de las

complicaciones asociadas<sup>[23]</sup>. La fisiopatología del FR es compleja y no se entiende por completo, pero participan factores como el daño endotelial, el desequilibrio entre mediadores vasodilatadores y vasoconstrictores (entre ellos el óxido nítrico y la endotelina 1, respectivamente); cambios microvasculares por microangiopatía progresiva y la obstrucción vascular por incremento de mediadores vasoconstrictores por la activación de la agregación plaquetaria y la alteración de la fibrinólisis<sup>[23,24]</sup>. Se ha descrito que el FR en pacientes con ES resulta de una microvasculopatía que involucra todas las capas de los vasos sanguíneos periféricos y en parte es ocasionada por la disfunción del endotelio<sup>[24]</sup>. La alteración frecuente y sostenida del tono microvascular es nocivo para el endotelio lo que conduce a disrupción de la barrera endotelial, reclutamiento de células inflamatorias, incremento en la permeabilidad vascular y fuga persistente al espacio extravascular lo que conduce eventualmente al edema local y las microhemorragias, la activación del endotelio con aumento de la expresión de moléculas de adhesión también favorece el reclutamiento de células inflamatorias desde la circulación<sup>[24]</sup>. En pacientes con ES se ha encontrado que el vasoespasmo grave de las arterias digitales y de los vasos termoreguladores de la piel con episodios repetidos de vasoconstricción pueden ocasionar un obstáculo a la microcirculación y daño a los tejidos por isquemia-reperfusión<sup>[24]</sup>.

La capilaroscopia del lecho ungueal (NFC, *nailfold capillaroscopy*, por sus siglas en inglés), es una herramienta no invasiva para evaluar la microcirculación que ha cobrado una gran relevancia en pacientes con ES, a tal grado que ha sido incluida como uno de los criterios para la clasificación de la ES<sup>[23]</sup>. La NFC se realiza en el lecho ungueal, donde los capilares de la fila distal de la dermis papilar se encuentran paralelos a la superficie de la piel lo que permite su visualización completa<sup>[23,25]</sup>. Esta técnica permite la valoración de la arquitectura, tamaño y número de los capilares del lecho ungueal. En pacientes con ES se han descrito patrones de esclerodermia por NFC que incluyen variables como cambio en el tamaño de los capilares (capilares gigantes), pérdida de capilares y microhemorragias<sup>[23]</sup>.

La vasculopatía en la ES es una causa importante de consulta al servicio de Urgencias, morbilidad (UD, infección, gangrena) y discapacidad asociada a la enfermedad y requiere un tratamiento multidisciplinario. Aunque existen múltiples terapias vasoactivas, los efectos adversos son comunes por lo que son poco tolerados y un gran número de pacientes experimentan enfermedad vascular refractaria a pesar del tratamiento, por lo que quedan necesidades aún en la atención de esta manifestación y sus complicaciones asociadas<sup>[23]</sup>.

Los leucotrienos (LT) son mediadores lipídicos potentes que poseen una gran variedad de funciones biológicas; son sintetizados a través de múltiples pasos enzimáticos a partir de los fosfolípidos de la membrana nuclear<sup>[26,27]</sup>, en la síntesis de estos mediadores participan las lipoxigenasas, que son enzimas que catalizan la inserción del oxígeno molecular en varias posiciones del ácido araquidónico (AA). La síntesis de los LT requiere de la 5-lipooxigenasa (5-LO), enzima clave que cataliza la formación de productos intermediarios<sup>[4,28]</sup>. La síntesis de los LT requiere la translocación reversible de la enzima 5-lipooxigenasa (5-LO) desde el nucleoplasma o el citosol hacia la región perinuclear. La 5-LO cataliza dos pasos clave en la vía de biosíntesis de los LT, actúa con la proteína activadora de la 5-LO (FLAP) para la oxigenación en la posición C5 del AA seguido de su deshidratación lo cual lleva a la formación de productos intermediarios inestables para convertir el AA de manera secuencial en intermediarios inestables ácidos 5-hidroperoxieicosatetraenoicos (5-HPETE) y luego a leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). El LTA<sub>4</sub> puede ser convertido a LT efectores por una o dos enzimas terminales. El LTA<sub>4</sub> es rápidamente hidrolizado por la enzima hidroxilasa de LTA<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>H) para formar el LTB<sub>4</sub>, o puede ser conjugado por la sintasa de LTC<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>S) para formar el LTC<sub>4</sub>. El LTC<sub>4</sub> es secuencialmente convertido en LTD<sub>4</sub> por la ruptura de un residuo de ácido glutámico por una enzima gamma-glutamil leucotrienasa. Por último, el LTD<sub>4</sub> se convierte en LTE<sub>4</sub> por acción de una dipeptidasa que escinde un residuo de glicina (Figura 1). El LTC<sub>4</sub>, el LTD<sub>4</sub> y el LTE<sub>4</sub> contienen un residuo de cisteína por lo que se denominan colectivamente cisteinil LT (CysLT)<sup>[28,29]</sup>.



**Figura 1.** Vía de la síntesis de los LT. Los miembros de la familia de los receptores de LT se muestran en amarillo y se ubican en el esquema asociados a sus ligandos. HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico, HPETE: ácido hidroxiperoxieicosatetraenoico, LO: lipooxigenasa, LTC<sub>4</sub>S: Sintasa de LTC<sub>4</sub>, LTA<sub>4</sub>: LTA<sub>4</sub> hidrolasa, LX: lipoxina, LT: leucotrieno<sup>[30]</sup>.

Los leucocitos constituyen la principal fuente de LT y su perfil depende del tipo de glóbulo blanco que lo sintetiza. Los neutrófilos producen principalmente LTB<sub>4</sub>, los eosinófilos y basófilos sintetizan CysLT, mientras los monocitos/macrófagos pueden generar ambos tipos de LT. Adicionalmente otras células como fibroblastos (FB), células epiteliales y plaquetas pueden sintetizarlos, pero en

menor grado<sup>[17]</sup>. Otras células no leucocíticas no tienen suficiente 5-LO y FLAP para sintetizar cantidades apreciables de LT del AA, estas células pueden expresar enzimas metabolizadoras de LTA<sub>4</sub> y pueden captar el LTA<sub>4</sub> derivado de leucocitos y metabolizarlo en LT bioactivos, un proceso denominado biosíntesis transcelular<sup>[29]</sup>.

Los LT actúan vía la activación de receptores de membrana acoplados a proteína G. Dependiendo del tipo de proteína G, los receptores transmiten la señal cambiando los niveles de cAMP intracelular, calcio y diacilglicerol<sup>[17]</sup>. Los receptores denominados CysLTR<sub>1</sub> y CysLTR<sub>2</sub>, median los efectos biológicos de los CysLT. Los CysLTR<sub>1</sub> se expresan en las células del músculo liso bronquial, FB, pulmón, bronquios, bronquiolos y mucosa respiratoria, así como en leucocitos sanguíneos, también se expresan en las células de músculo liso de las arterias coronarias y vena safena, bazo, intestino delgado y placenta. Los receptores CysLTR<sub>2</sub> se expresan en las mucosas y en el epitelio glandular, en bazo, leucocitos, FB y plaquetas, células de músculo liso vascular de las coronarias y vena safena, células endoteliales del cordón umbilical, en el cerebro y médula espinal, en las glándulas adrenales y en el corazón. Las diferencias entre la estructura, distribución y los ligandos de unión de ambos receptores, correlacionan con las funciones biológicas divergentes<sup>[28,30]</sup>.

La bioactividad del LTB<sub>4</sub> también es mediada por receptores acoplados a proteína G, denominados BLT<sub>1</sub> y BLT<sub>2</sub>. El receptor BLT<sub>1</sub>, un receptor de alta afinidad, se expresa en leucocitos, células de músculo liso bronquial y de las arterias coronarias, células endoteliales de cordón umbilical y lesiones ateroscleróticas, mientras que el BLT<sub>2</sub> se encuentra en bazo, hígado, leucocitos, ovario, y lesiones de aterosclerosis<sup>[30]</sup>. El BLT<sub>1</sub> media casi todas las acciones de quimioatracción y proinflamatorias del LTB<sub>4</sub>. El receptor BLT<sub>2</sub> también une otros productos de la 5-LO<sup>[28-30]</sup>.

La biosíntesis de LT está regulada por la cantidad de AA libre que la fosfolipasa A<sub>2</sub> libera de los fosfolípidos de la membrana, el nivel de las proteínas de la vía de la 5-LO, la actividad catalítica de las enzimas y de otras moléculas pequeñas.

Asimismo, la transcripción de los genes de las enzimas de la vía sintética de los LT está regulada por diversos estímulos, entre ellos algunas citoquinas, como el TGF- $\beta$ , la leptina, la endotelina y los glucocorticoides<sup>[29]</sup>.

Los LT son mediadores proinflamatorios y profibróticos potentes<sup>[26,28,29,31]</sup>, promueven el movimiento y la función de todos los subgrupos de leucocitos hacia los tejidos. El LTB<sub>4</sub> contribuye al reclutamiento de los leucocitos en los compartimentos tisulares, de hecho, es un potente activador y quimioatrayente de neutrófilos, a través de la estimulación de la adhesión al endotelio vascular y actúa como un factor quimioquinético y quimiotáctico. Activa granulocitos y prolonga su supervivencia, lo cual resulta en el desarrollo y persistencia de lesiones inflamatorias. A través de la actividad de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y AP-1, el LTB<sub>4</sub> estimula la síntesis de varias citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 8 (IL-8) y el factor del crecimiento de fibroblastos (FGF). El LTB<sub>4</sub> también activa monocitos/macrófagos para sintetizar y liberar mediadores responsables del reclutamiento de otras células inmunes como los linfocitos, en los procesos inflamatorios. Los linfocitos T activados pueden a su vez, inducir el reforzamiento de la expresión de 5-LO/FLAP en macrófagos favoreciendo la síntesis de nuevos LT, como un mecanismo de retroalimentación positiva que juega un papel en la amplificación de la respuesta inflamatoria<sup>[17]</sup>.

Los LT se han implicado en varias enfermedades fibróticas y en modelos animales de fibrosis. En humanos, estas incluyen la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la remodelación de la vía aérea en el asma bronquial, la bronquiolitis obliterante, la asbestosis, el daño pulmonar agudo, la EPI asociada a ES, entre otras<sup>[29,32]</sup>. En las enfermedades por remodelamiento pulmonar, entre ellas la EPI, la hipótesis del desbalance de los eicosanoides se ha propuesto que participa en su fisiopatología, en ésta los LT profibróticos predominan sobre las prostaglandinas antifibróticas (PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>)<sup>[26,33]</sup>. Entre sus actividades profibróticas los LT estimulan la proliferación, quimiotaxis y diferenciación de FB y miofibroblastos, así como la inducción de la síntesis de colágena, estimulan las células epiteliales para que

sinteticen TGF- $\beta$ , el cual juega un papel pivote en los procesos de fibrosis. Los LT pueden contribuir en la regulación, síntesis, secreción y activación de metaloproteinasas que participan en la remodelación del tejido conjuntivo<sup>[17]</sup>. También son factores de crecimiento y diferenciación de otros tipos celulares incluyendo a los linfocitos, células epiteliales y endoteliales, las cuales están activamente involucradas en la inflamación, la fibrosis y la función vascular<sup>[17,28,29,31,34]</sup>. Los LT han sido ampliamente estudiados en la FPI y en su modelo animal, la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina del ratón. En este modelo, se ha descrito un importante rol de los LTB<sub>4</sub> y los CysLT para la inducción de la fibrosis a través del receptor BLT<sub>1</sub> y el receptor CysLTR<sub>2</sub><sup>[33, 35]</sup>, y la eliminación<sup>[35,36]</sup> o el bloqueo de los receptores de los LT<sup>[37]</sup>, o de sus enzimas biosintéticas, incluyendo la 5-LO, la LTC<sub>4</sub> sintasa<sup>[34,38]</sup>, y la LTA<sub>4</sub> hidrolasa<sup>[32]</sup> se han relacionado con una reducción significativa en el proceso de fibrosis. La evidencia sugiere que los LT conllevan a fibrosis al inducir la liberación del TGF- $\beta$  por los macrófagos y las células epiteliales<sup>[26,36,39]</sup>. Otros investigadores han demostrado que en los FB de ratas el LTB<sub>4</sub> puede inducir la proliferación y la migración y sugieren que esto podría ser en respuesta a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>[40]</sup>.

Dentro de las actividades vasculares de los LT, son potentes vasoconstrictores y actúan en muchos lechos vasculares<sup>[41]</sup>, incluyendo los vasos de la microcirculación pulmonar, las arteriolas mesentéricas en ratas y los microvasos coronarios<sup>[42]</sup>. En algunos modelos animales, se ha reportado que los LT inducen la vasoconstricción ya sea directamente a través de los receptores de LT o indirectamente al estimular otros mediadores lipídicos como el tromboxano y las prostaglandinas<sup>[42]</sup>. Los CysLT son potentes vasoconstrictores en el pulmón y podrían ser importantes durante la respuesta vasoconstrictora en la hipoxia pulmonar. Sin embargo, hay una gran variabilidad dependiente de la especie estudiada<sup>[43]</sup>. También se ha demostrado que el LTB<sub>4</sub> está involucrado en la respuesta microvascular a la hipoxia, a través de la generación de ROS y favoreciendo la adherencia endotelial de los leucocitos<sup>[44]</sup>.

Asimismo, los CysLT son producidos durante el daño vascular, ya que modifican la función vascular a través de una amplia gama de efectos como la constricción de la microvasculatura, promueven la permeabilidad vascular de las vénulas poscapilares, reducen el flujo coronario y la angiogénesis patológica de la retina<sup>[45]</sup>. Los CysLT inducen el reclutamiento de leucocitos en la pared arterial lo que contribuye al remodelamiento vascular y la trombosis<sup>[29]</sup>. También incrementan la permeabilidad vascular, inducen proliferación del músculo liso vascular<sup>[46]</sup> y la contractilidad del músculo vascular y bronquial<sup>[4,29]</sup>. Hay evidencia de que los CysLT median la broncoconstricción, la secreción de moco y el edema de la vía aérea, así como regulan la función endotelial al modular la inflamación a través del receptor CysLTR<sub>1</sub> y la inflamación, la proliferación de las células endoteliales a través de los receptores, la permeabilidad vascular por los CysLTR<sub>2</sub><sup>[28,29,45]</sup>. Ambos receptores se han involucrado con la fibrosis pulmonar en modelos animales y los CysLTR<sub>2</sub> con la fibrosis cutánea<sup>[30]</sup>. Todos estos mecanismos vasculares y profibróticos activados por los CysLT sugieren que podrían jugar un rol importante en la patogénesis del FR que se observa en la ES. Se han encontrado niveles elevados LT, en muestras de líquido de LBA, en pacientes con EPI asociada a ES; además, parece no haber un balance en las cantidades de eicosanoides antiinflamatorios/antifibróticos<sup>[22]</sup>. En un estudio realizado por Kowal-Bielecka y colaboradores (2003) se encontraron niveles de LTB<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> en líquido de LBA significativamente más altos en pacientes con ES con EPI (251 ± 170 pg/mL y 479 ± 301 pg/mL, respectivamente) que en pacientes sin EPI (114 ± 86 pg/mL y 110 ± 67 pg/mL, respectivamente) y que en controles sanos (86 ± 49 y 110 ± 67 pg/mL, respectivamente). Además, después del tratamiento con ciclofosfamida intravenosa, hubo una reducción significativa de la concentración de LTB<sub>4</sub> en 6 de estos pacientes<sup>[39]</sup>. En un estudio posterior, se confirmó el hallazgo de niveles más elevados de LTB<sub>4</sub> en el LBA (promedio ± SEM, 248 ± 29 pg/mL) en pacientes con EPI comparados con pacientes sin EPI (LTB<sub>4</sub> 119 ± 35 pg/mL; p < 0.05) y con controles sanos (85 ± 12 pg/mL; p < 0.05)<sup>[47]</sup>. Asimismo, Tufvesson y colaboradores (2010) encontraron mayores niveles de CysLT en el condensado de aire espirado (CAE), pero niveles similares de LTB<sub>4</sub>



en un grupo con ES comparado con los controles. Los niveles de CysLT correlacionaron con los niveles de LTB<sub>4</sub>. El hallazgo de niveles elevados de CysLT, pero no de LTB<sub>4</sub> contrasta con las publicaciones que han reportado un aumento en LTE<sub>4</sub> y LTB<sub>4</sub> en el líquido de LBA en pacientes con ES, específicamente en aquellos pacientes con EPI determinada por TACAR. Esta diferencia pudiera ser explicada por el tiempo de evolución de la enfermedad en los pacientes, la cual fue menor en este estudio. En este contexto, los hallazgos sugieren que la inflamación dirigida por los CysLT pudiera aparecer tempranamente en el proceso patológico, mientras el incremento de LTB<sub>4</sub>, con una infiltración asociada a neutrófilos, probablemente aparece tardíamente y es más pronunciada de acuerdo con la extensión de la enfermedad<sup>[48]</sup>.

Por otro lado, se ha reportado un incremento en el LTE<sub>4</sub> en la orina de pacientes con ES (LTE<sub>4</sub> 188 ± 33 pg/mg creatinina, n=7) con respecto a controles sanos (68 ± 4.3 pg/mg de creatinina, n=6 con una p < 0.02)<sup>[49]</sup>.

Kowal-Bielecka y colaboradores encontraron una expresión significativamente mayor de 5-LO en especímenes de piel de pacientes comparado con los controles en células del infiltrado inflamatorio perivascular y en los FB. Asimismo, los sobrenadantes de FB cultivados de piel del grupo con ES tuvieron cantidades significativamente más altas de LTB<sub>4</sub> después de la estimulación al compararlos con los de los controles sanos, lo que sugiere que la vía de la 5-LO pudiera jugar un papel en la patogénesis de la ES<sup>[4]</sup>. Xiao y colaboradores mostraron en cultivo de FB de lesiones tempranas de pacientes con ES difusa, que la expresión de 5-LO fue significativamente mayor comparada con FB de controles sanos y que la inhibición de la 5-LO con Mk886 (un inhibidor específico de la 5-LO) estuvo asociado con la disminución de la expresión de colágena tipo I y III así como del TGF-β y el factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), dos citoquinas de gran importancia en la patogénesis de la ES<sup>[50]</sup>.

Los infiltrados inflamatorios perivasculares son un hallazgo característico en la patogénesis en las lesiones cutáneas de la ES temprana. La patogénesis de la ES involucra la interacción de varios tipos celulares, en particular, las células endoteliales vasculares, los leucocitos y los FB; estos estudios sugieren que los

FB no sólo participan en la patogénesis de la ES a través de la producción de colágena, sino también participan activamente en la inflamación a través de la secreción de diversos mediadores, entre ellos los LT<sup>[4]</sup>.

Estudios en pacientes con ES han revelado que los neutrófilos y las células mononucleares de sangre periférica sintetizan mayores cantidades de LT comparado con individuos sanos. Además, en un estudio de pacientes con ES, se encontró asociación entre los niveles elevados de LTB<sub>4</sub> en cultivo de células mononucleares periféricas con la gravedad y progresión de la enfermedad<sup>[17]</sup>.

Por otro lado, en pacientes con hipertensión arterial pulmonar primaria, Wright y colaboradores mostraron la sobreexpresión de 5-LO y FLAP en los pulmones de estos pacientes, indicando que la vía de los LT pudiera estar involucrada en la patogénesis de esta entidad<sup>[51]</sup>, aunque en los casos ES con HAP no se ha explorado esta posibilidad, los LT pudieran estar implicados.

La activación de la vía 5-LO se ha implicado en muchas alteraciones inflamatorias, incluyendo el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la fibrosis quística, la enfermedad intestinal inflamatoria y las condiciones asociadas con fibrosis excesiva, como la FP idiopática y en modelos de fibrosis inducida por quimioterapia (bleomicina)<sup>[27,33,52-59]</sup>. Los LT se han estudiado de manera prominente en el asma bronquial, en esta enfermedad se ha descrito que juegan un papel importante en la fisiopatología, participando principalmente en la remodelación de las vías áreas. En estos pacientes se ha reportado un incremento en los niveles séricos de LTB<sub>4</sub> y de LTE<sub>4</sub> urinario comparado con sujetos sanos<sup>[59-62]</sup> y el uso de medicamentos antileucotrienos ha demostrado utilidad terapéutica en diversos estudios clínicos<sup>[54,55,57,58,63]</sup>, sin embargo, no se ha estudiado su uso en otros padecimientos que presentan alteración de las vías de fibrosis, especialmente la ES.

Hay otros datos que sugieren que los LT pudieran estar implicados en la patogénesis de la ES, por ejemplo, se han demostrado niveles elevados de TGF- $\beta$  en pacientes con ES y es bien conocido que este factor de crecimiento juega un papel importante en esta enfermedad<sup>[1]</sup>. A este respecto, estudios *in vitro* de Steinhilber y colaboradores en células HL-60 mostraron que el TGF- $\beta$  induce la

expresión de la 5-LO durante su diferenciación, lo que sugiere que este factor pudiera ejercer un efecto en favorecer la fibrosis a través de los LT<sup>[64]</sup>. Por otro lado, en la ES predominan las respuestas de linfocitos cooperadores con perfil Th2, de manera que en las lesiones cutáneas predominan células CD4<sup>+</sup> del tipo Th2 y hay un incremento paralelo en los niveles séricos de citoquinas derivadas de estos linfocitos. En relación con esto, los LT tienen una función en la amplificación de las respuestas inflamatorias mediadas por los linfocitos Th2 y sus citoquinas pueden influir en la expresión de los receptores de los CysLT<sup>[1,29]</sup>. Estos datos sugieren que los LT pueden interactuar con otros mediadores biológicos presentes en la ES y formar parte de la patogénesis de esta enfermedad.

En pacientes con asma bronquial, las concentraciones de mediadores inflamatorios como los CysLT y el LTB<sub>4</sub> se han examinado en varias muestras biológicas como LBA, esputo inducido, CAE y orina. La inducción de saliva se ha validado como una herramienta simple y no invasiva para investigación de procesos inflamatorios, por ejemplo, el asma, y se ha reportado que los CysLT pueden ser medidos en saliva<sup>[65-67]</sup> y se ha sugerido que incluso puede utilizarse para el monitoreo del efecto de los fármacos que afectan la vía de los LT<sup>[67]</sup>. Sin embargo, aún no se han estudiado los niveles de estos mediadores en muestras de saliva de pacientes con ES.

En conclusión, los LT pueden jugar un papel importante en la regulación de todos los procesos vitales para la patogénesis de la ES, llámense inflamación, función vascular y remodelación del tejido conjuntivo. Los resultados en estudios humanos y datos experimentales sugieren que el desequilibrio entre varias clases de eicosanoides, particularmente el exceso de LT puede ser clave en la patogénesis de la ES. Los datos disponibles sugieren que una excesiva síntesis de LT puede contribuir al desarrollo y progresión de la ES. Por tanto, el bloqueo de las vías de los LT pareciera ser una nueva y prometedor blanco de la terapéutica de la ES.

La ES se acompaña de morbilidad importante con implicaciones en términos de mortalidad; los tratamientos actuales están lejos de ser curativos y de reducir de manera cuantitativa la morbimortalidad.

Los LT participan en la fibrogénesis en diversas enfermedades. La etiopatogenia de la ES no está bien entendida a pesar de los esfuerzos que se han realizado a este respecto. En esta enfermedad la fibrosis juega un papel primordial en la disfunción de órganos y sistemas y son los FB las células centrales en la producción de la fibrosis a través de su activación y secreción de colágena; sin embargo, no se conocen a fondo cuales son las vías que llevan a la inducción de estas respuestas de fibrosis anormal irreversible. Es claro que la patogénesis de la ES involucra la interacción de numerosos mediadores. Sin embargo, los LT han recibido poca atención a pesar de su papel central en las vías de fibrosis y de la función vascular. Son pocos los estudios que han investigado el papel de los LT en la ES y no se ha investigado su relación con otros mediadores profibróticos. No hay reportes de determinación de los LT en muestras de plasma y saliva, y solo muy pocos casos en orina (n=7) de pacientes con ES. Además, no se ha investigado la relación de los niveles de LT con las manifestaciones de la ES, especialmente las manifestaciones vasculares.

### **JUSTIFICACIÓN.**

Este estudio pretende profundizar el papel que pudieran jugar los LT en la etiopatogenia de las manifestaciones vasculares y la fibrosis en la ES, con el fin de abrir nuevas líneas de investigación en las enfermedades reumáticas autoinmunes como parte de los procesos de inflamación, vasculopatía y fibrogénesis. Por otro lado, pretende proveer bases para la aplicación terapéutica con fármacos antileucotrienos como parte del arsenal terapéutico de la enfermedad, como un adyuvante para modificar las vías de fibrosis antes de que ésta sea irreversible y ocasione daño a órganos blanco con todas las complicaciones que ello implica.

Cabe mencionar, que las enfermedades autoinmunes comparten el espectro de algunas manifestaciones clínicas, incluyendo las manifestaciones vasculares como el FR y la enfermedad pulmonar intersticial, que pueden ocurrir en no solo en la

ES, sino también en otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la dermatopolimiositis, de tal manera que, de encontrar una relación entre el proceso de la vasculopatía y la fibrosis con los LT, pudiera tener un impacto relevante para entender la patogénesis de las complicaciones en otras enfermedades autoinmunes y en su tratamiento. A este respecto, si bien la ES tiene una menor incidencia y prevalencia que otras enfermedades autoinmunes, la magnitud de la gravedad es tal, en términos de morbilidad y mortalidad, que se convierte en un modelo de vasculopatía y de fibrosis de especial interés a estudiar.

### **OBJETIVO GENERAL.**

Comparar los niveles de LT en plasma, saliva y sobrenadante de cultivo de FB de pacientes con esclerosis sistémica y un grupo control y determinar su relación con manifestaciones vasculares.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar los niveles de LTB<sub>4</sub> y CysLT en plasma y saliva en un grupo de pacientes con ES y un grupo control
2. Determinar los niveles de LTC<sub>4</sub> en el sobrenadante de cultivo de FB provenientes de biopsia de piel, en un grupo de pacientes con ES y un grupo control
3. Establecer la posible relación entre los niveles de LT y las manifestaciones vasculares de la ES.
4. Establecer la posible relación entre los niveles de LT y las anomalías capilaroscópicas.
5. Determinar los niveles de TGF- $\beta$  e IL-10 en el suero en un grupo de pacientes con ES y un grupo control
6. Establecer la posible relación entre los niveles de IL-10 y TGF- $\beta$  y las manifestaciones vasculares de la ES.
7. Establecer la posible relación entre los niveles de IL-10 y TGF- $\beta$  con las anomalías capilaroscópicas.

8. Establecer la relación entre los niveles de LT y los niveles de TGF- $\beta$  e IL-10.
9. Determinar la expresión de mRNA de los genes COL1A1, COL3A1, CTGF, TGFB1, CYSLTR1, CYSLTR2, LTB1 en un grupo de pacientes con ES y un grupo de controles y comparar su expresión de manera basal y tras estimulación con ionóforo y LT (LTB4 y CysLT)
10. Comparar la expresión de mRNA de los genes COL1A1, COL3A1, CTGF, TGFB1, CYSLTR1, CYSLTR2, LTB1 en FB provenientes de controles tras estimulación con suero de pacientes y suero autólogo

### **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.**

1. ¿Estará más elevada la concentración de LT en plasma, saliva y sobrenadante de cultivos de FB en pacientes con ES comparada con los controles?
2. ¿Serán mayores los niveles de LT en pacientes que presentan manifestaciones clínicas vasculares o anomalías capilaroscópicas comparados con pacientes asintomáticos o los controles sanos?
3. ¿Estará más elevada la concentración de IL-10 y TGF- $\beta$ 1 en los pacientes con ES comparada con los controles?
4. ¿Serán mayores los niveles de IL-10 y TGF- $\beta$ 1 en los pacientes que presentan manifestaciones clínicas vasculares o anomalías capilaroscópicas comparados con los pacientes asintomáticos o los controles sanos?
5. ¿Habrá correlaciones entre los niveles de LTB4 y CysLT en el plasma y la saliva?
6. ¿Habrá correlaciones entre los niveles de LTB4 y CysLT y el TGF- $\beta$  e IL-10?
7. ¿Será más elevada expresión del mRNA de los genes COL1A1, COL3A1, CTGF, TGFB1, CYSLTR1, CYSLTR2, LTB1 de manera basal y la tras estimulación con en los FB provenientes de los pacientes comparado con los controles?

8. ¿Será más elevada la expresión del mRNA de los genes COL1A1, COL3A1, CTGF, TGFB1, CYSLTR1, CYSLTR2, LTB1 en los FB de controles estimulados con suero de proveniente de pacientes comparada con la estimulación con suero autólogo?

### **HIPÓTESIS GENERAL.**

La concentración de LT en plasma, saliva y sobrenadante de cultivo de FB estará más elevada en los pacientes con ES comparada con los controles.

### **HIPÓTESIS PARTICULARES.**

1. Los niveles de LT serán mayores en pacientes con manifestaciones vasculares comparados con los pacientes sin manifestaciones vasculares clínicas o controles sanos.
2. Los niveles de LT serán mayores en pacientes con anomalías en la capilaroscopia que en los que tienen capilaroscopia normal.
3. Los niveles de IL-10 y TGF- $\beta$ 1 estarán más elevados en el grupo de pacientes comparado con el grupo control.
4. Los niveles de LT tendrán una correlación positiva con los niveles de las citoquinas profibróticas IL-10 y TGF- $\beta$ 1.
5. La expresión del mRNA de los genes COL1A1, COL3A1, CTGF, TGFB1, CYSLTR1, CYSLTR2, LTB1 estará más elevada de manera basal, tras estimulación con ionóforo, con LTB4 y CysLT en los FB provenientes de pacientes comparado con controles.
6. La expresión del mRNA de los genes COL1A1, COL3A1, CTGF, TGFB1, CYSLTR1, CYSLTR2, LTB1 en los FB de controles estará mas elevada tras estimulación con suero de proveniente de pacientes comparada con la estimulación con suero autólogo.

### **DISEÑO.**

***Tipo de estudio.*** Estudio transversal y comparativo.

## MATERIAL Y MÉTODO

### *Población elegible y criterios de selección*

Criterios de inclusión. Pacientes y controles. Se reclutaron pacientes y voluntarios sanos de 18 años o mayores, y que estuvieron de acuerdo en participar bajo consentimiento informado; ni los pacientes ni los controles sanos tuvieron historia previa de asma bronquial, rinitis, enfermedades alérgicas u otras enfermedades sistémicas. Los pacientes fueron reclutados en el departamento de Reumatología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez de enero de 2013 a junio del 2014. Criterios de inclusión. Todas las pacientes cumplieron los criterios de para ES de 2013 (Tabla 1) propuestos por el Colegio Estadounidense de Reumatología (ACR) y la Alianza Europea de Asociaciones de Reumatología (EULAR)<sup>[68]</sup>.

**Tabla 1.** Criterios para la clasificación de la Esclerosis Sistémica propuestos del Colegio Estadounidense de Reumatología/Alianza Europea de Asociaciones de Reumatología.

ÍTEM	SUB-ÍTEM	PUNTAJE
Engrosamiento cutáneo de los dedos de ambas manos que se extiende proximal a las articulaciones metacarpofalángicas (criterio suficiente)	-	9
Engrosamiento cutáneo de los dedos (solo contar el puntaje más alto)	-Edema de dedos o dedos en salchicha -Esclerodactilia (distal a las articulaciones metacarpofalángicas pero proximal a las articulaciones interfalángicas proximales)	2 4
Lesiones en los pulpejos (solo contar el puntaje más alto)	-Úlceras digitales -Cicatrices puntiformes en los pulpejos	2 3
Telangiectasias	-	2
Capilares ungueales anormales	-	2
Hipertensión arterial pulmonar y/o enfermedad pulmonar intersticial (puntaje máximo de 2)	-Hipertensión arterial pulmonar -Enfermedad pulmonar intersticial	2 2
Fenómeno de Raynaud	-	3
Autoanticuerpos relacionados a ES (anti-centrómero, anti-topoisomerasa I [anti-Scl-70], anti-RNA polimerasa III) (puntaje máximo es 3)	-Anti-centrómero -Anti-topoisomerasa I -Anti-RNA-polimerasa III	3

Se clasifica a un paciente con ES definitiva si obtiene un puntaje de  $\geq 9$ . ES: Esclerosis sistémica<sup>[68]</sup>.



Se incluyeron pacientes con ES limitada y difusa. Los controles fueron voluntarios sanos fueron acompañantes (parientes o amigos) o personal del hospital.

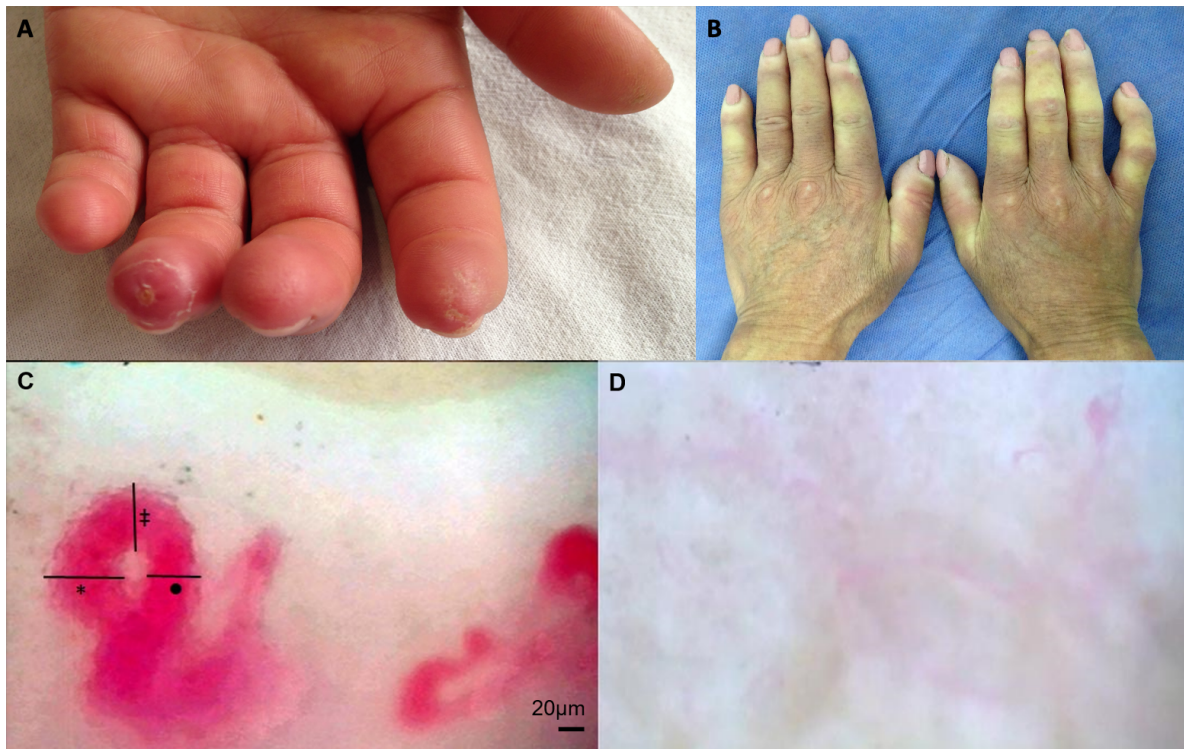
**Criterios de exclusión.** Pacientes con asma, enfermedades alérgicas, enfermedades crónicas o inflamatorias, enfermedad pulmonar conocida o síndromes de superposición con otra enfermedad autoinmune o que no aceptaron participar en el protocolo.

### **Estrategia general**

**Evaluación clínica.** Se recabaron datos sociodemográficos como edad, género, peso, talla e índice de masa corporal (IMC). Se realizó una historia clínica en todas las pacientes. Se recabaron datos demográficos y manifestaciones vasculares al momento del reclutamiento. Las manifestaciones vasculares incluyeron el FR, UD y las cicatrices puntiformes desde el inicio de la enfermedad y las encontradas al momento de la exploración física. Para evaluar el grado de esclerosis cutánea se utilizó el índice de Rodnan modificado<sup>[69]</sup>. Se tomaron fotografías clínicas de las manifestaciones (Figura 2 A,B). En el grupo de pacientes se recabaron complicaciones asociadas a la enfermedad, datos de laboratorio incluyendo el perfil de autoanticuerpos (anticuerpos antinucleares en células Hep-2 por inmunofluorescencia, anti-topoisomerasa-I y anticuerpos anti-centrómero), resultados de estudios de gabinete y uso de medicamentos a través de la historia y el expediente clínicos.

**NFC.** Se realizó en todas las pacientes y controles en el cuarto dedo de la mano derecha a temperatura ambiente con el sujeto sentado. Se evaluó el mismo dedo en todos los casos para reducir la variabilidad que se puede encontrar al comparar diferentes dedos. Se eligió el cuarto dedo para la evaluación, debido a que se ha reportado previamente que en este dedo son más frecuentes los capilares dilatados o gigantes y las hemorragias en pacientes con ES. Asimismo, hay una mayor transparencia de la piel en este dedo comparado con otros dedos<sup>[70]</sup>. Este abordaje se ha utilizado en otros estudios<sup>[25]</sup>. Se usó un capilaroscopio modelo JH-1004 C con una magnificación total de 380X para la obtención de las imágenes, las cuales fueron analizadas con el software MicroCirculationXP (Jiangsu Jiahua

Electronic Instrument Co., Xuzhou, China). Se registraron la morfología, la arquitectura y las dimensiones capilares del lecho ungueal, incluyendo los diámetros de las ramas aferentes, eferentes y apicales de los capilares. La dimensión de los capilares se clasificó en todos los sujetos como normal (diámetro  $< 20 \mu\text{m}$ ), ectasia (diámetro entre  $20\text{-}50 \mu\text{m}$ ) o capilares gigantes ( $>50 \mu\text{m}$ ). Otros parámetros se clasificaron de acuerdo con otros previamente publicados (Figura 2C,D)<sup>[25]</sup>.



**Figura 2.** Evaluación clínica y de la NFC. Las características clínicas y capilaroscópicas fueron evaluadas en los grupos. Cicatrices puntiformes de un caso representativo (A). Paciente con presencia de FR en la exploración física al momento de la evaluación clínica (B). NFC de una de las pacientes incluidas en el estudio; se muestra la representación esquemática de los diámetros capilares evaluados en todos los individuos en la NFC (\*) rama arterial (•), rama venosa y (‡) diámetro superior del asa capilar. La NFC se evaluó en todos los individuos y se clasificó en los patrones de esclerodermia “temprano”, “activo” y “tardío” o capilaroscopia “normal”; un caso de patrón “tardío” de un paciente incluido en el estudio en donde se observa una pérdida grave de los capilares con amplias zonas avasculares y desorganización grave de la estructura capilar normal (D). NFC: capilaroscopia del lecho ungueal.

**Obtención de muestras.** Las muestras de plasma, suero y saliva fueron recolectadas en ayuno, entre las 7:00 y las 9:00 am, el mismo día de la valoración clínica. La sangre venosa periférica fue colectada en tubos con sistema de vacío (Vacutainers BD) con heparina de sodio para la recolección de plasma y en tubos secos para la recolección de suero para los experimentos con los FB. Se recolectaron las muestras de saliva no estimulada en la mayoría de los sujetos, entre las 7:00 y las 9:00, el mismo día de la evaluación clínica. Se indicó a los casos y controles que se sentaran cómodamente con la espalda recta y los pies apoyados en el suelo, la cabeza ligeramente inclinada hacia abajo, los labios entreabiertos y en relajación por 5 minutos. Se les pidió acumular toda la saliva en la boca hasta obtener la indicación, por el investigador, de depositar la saliva en un cono de plástico con la punta truncada simulando un embudo, el cual dejaba fluir la saliva aun tubo graduado milimétrico de polipropileno de 15 mL cada 30 segundos por intervalo de 5 minutos. En caso de obtener una muestra menor a 3 mL, se procedió a la toma de saliva estimulada. En este caso se indicó mantener la posición por 5 minutos previo a la estimulación y posteriormente se colocó una pastilla de cera debajo de la lengua por 30 segundos, una vez suavizada la tableta se solicitó a las pacientes que masticaran la pastilla de la manera usual en la que mastican un chicle bilateralmente, y se indicó el mismo procedimiento de acumular la saliva por 30 segundos y depositar la saliva hacia los tubos de recolección hasta alcanzar los 5 minutos de acuerdo con un método previamente publicado<sup>[71]</sup>. Las muestras de sangre y saliva fueron centrifugadas a  $2600 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 15 minutos y se prepararon alícuotas de  $300\mu\text{L}$  en tubos de Eppendorf, las cuales se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento.

**Inmunoensayos enzimáticos (EIA) para la determinación de LT.** Las muestras fueron enviadas para su procesamiento al sistema de servicios analíticos de *Cayman Chemical* en Ann Harbor, Michigan, EUA. La determinación de los niveles de LT se realizó a través de EIA, lo niveles de LTB<sub>4</sub> y CysLT en plasma y saliva fueron determinados con los kits *Cysteinyl Leukotriene Express EIA* y *Leukotriene B<sub>4</sub> Express* por triplicado. Se siguieron los protocolos de los kits por los servicios analíticos de *Cayman Chemical*. Los ensayos de CysLT y LTB<sub>4</sub> en plasma y saliva

se realizaron después de la purificación de las muestras, donde se utilizaron los protocolos de purificación para cada tipo de kit, para evitar la interferencia por proteínas y contaminantes. Los niveles de LTC<sub>4</sub> se determinaron con el kit *Leukotriene C4 EIA* en el sobrenadante de cultivo de los FB.

**Determinación de IL-10 en suero.** Los niveles de IL-10 en suero fueron determinados usando un kit de EIA (Prepotech, NJ, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas de poliestireno de 96 pozos fueron recubiertas con 100 µl por pozo del anticuerpo de captura diluido a 0.5 µg/mL en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y fueron incubadas toda la noche a temperatura ambiente. Después del lavado y bloqueo de cada pozo con albúmina sérica bovina al 1%-PBS por 1 hora, se agregaron el estándar y las muestras de suero a cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas. Después del lavado de las placas, éstas fueron incubadas por al menos 2 horas con 100 µL del anticuerpo de detección a una concentración de 0.5 µg/mL. Después del lavado de las placas, se agregó el conjugado de avidina-HRP (por sus siglas en inglés, peroxidasa de rábano picante, 1:2000) a cada pozo y las placas fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas y reveladas con solución ABTS, según las instrucciones del fabricante. Los valores de absorbancia fueron leídos a 450 nm en un lector de placas (*DYNEX Technologies, modelOpsys MR*, Chantilly, VA, USA) y las concentraciones fueron determinadas mediante una curva estándar de valores conocidos del estándar de IL-10 proveído con el kit.

**Determinación de TGF-β1 en suero.** El TGF-β1 fue cuantificado utilizando el kit *flex set beads* de BD Bioscience (San Jose, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del protocolo del fabricante. Se prepararon las perlas y se permitió su estabilización, mientras tanto, las muestras de suero fueron activadas usando 1 N HCL por 10 minutos y se detuvo la reacción con 1.2 N NaOH. Una vez activadas, las muestras fueron incubadas con las perlas en la oscuridad a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con el buffer de lavado y fueron incubadas con el reactivo *human TGF-β1 PE detection reagent* por 2 horas en la oscuridad. Finalmente, las perlas fueron

lavadas mediante centrifugación con el buffer de lavado. Las perlas fueron leídas en un sistema de citometría de flujo FACSCalibur (BD Bioscience) y los datos fueron analizados usando el software FCAP versión 3.0 de BD bioscience. Las concentraciones fueron calculadas usando una curva estándar de concentraciones conocidas proveída con el kit.

***Procedimiento para la toma de biopsia de piel.*** En un subgrupo de pacientes y controles se realizó la biopsia de piel en la porción lateral de la cara anterior del antebrazo distal para la obtención de fibroblastos cutáneos. Previa asepsia, se realizó antisepsia de la zona con solución de yodo polividona al 10% por 5 minutos, posteriormente se colocó campo estéril y se aplicó anestesia local con lidocaína simple al 5%; una vez conseguida la anestesia de la zona, se tomó una biopsia de piel de 3 mm de diámetro por medio de sacabocados estériles de 3mm ("punch") a cada individuo. Los cilindros cutáneos se depositaron en tubos de polipropileno de 15mL con 2mL de medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) bajo en glucosa, con glutaMAX (aminoácidos, vitaminas y sales inorgánicas) y piruvato, y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento (<4 horas). Se comprimió la herida con gasa estéril comprobando adecuada hemostasia y se aplicó ácido fusídico al 2% en la herida y se cubrió con parche. Se proporcionó ácido fusídico al 2% para su aplicación cada 12 horas hasta el cierre de la herida y se indicaron los cuidados de esta hasta la completa cicatrización. Se prepararon cultivos de FB a partir de los especímenes de las biopsias de piel.

***Procedimiento para el cultivo de FB.*** El procedimiento de cultivo se realizó en una campana de flujo laminar y se realizó para cada muestra. Se utilizó el método del explante<sup>[72]</sup>. Se depositó cada espécimen de piel en una caja de Petri estéril, se cortaron con hoja de bisturí #22 en piezas de aproximadamente 0.5mm de diámetro o del tamaño de la cabeza de un alfiler, obteniéndose de 8 a 10 piezas de cada muestra, dichas piezas fueron transferidas a frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup> nuevos y estériles con pinzas estériles y se acomodaron en la superficie del frasco separadas entre ellas, dejando secar 5 minutos o hasta que se formara un halo alrededor de las mismas lo cual indicaba la adherencia del tejido a la pared del

frasco. Posteriormente, se agregaron 6mL de DMEM suplementado con suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés) al 20%, solución de antibióticos (penicilina/estreptomicina al 1%), anfotericina B al 1% y HEPES al 1% teniendo cuidado de no despegar el tejido de la superficie del frasco y se incubaron a 37 °C en un ambiente humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%. Se observó el crecimiento diario bajo microscopio invertido con objetivo 10x hasta observar el crecimiento de queratinocitos y FB. A los 7 días de la implantación se cambiaba el medio con DMEM preparado (DMEM con FBS al 10%, antibióticos y HEPES al 1%). Los cultivos fueron revisados diariamente para observar el crecimiento celular y vigilar datos de contaminación, y se cambió el medio por medio fresco preparado cada 3-4 días. Una vez que se obtenía la confluencia de los FB en aproximadamente el 80% de la superficie del frasco se procedía a despegar los FB para separarlos de los queratinocitos (aproximadamente después de 3-4 semanas después de la implantación), ya que los FB no requieren de otras células para su supervivencia (capa alimentadora), tienen una mayor tasa de supervivencia, proliferación y crecimiento<sup>[73]</sup> y sus necesidades nutricionales son menores. Para despegar los FB se agregaba 0.5mL de solución de tripsina/EDTA al 0.05% y 0.5 mL de solución de tripsina al 0.25% hasta observar el despegamiento celular bajo microscopio invertido. Una vez despegadas las células se agregaban 5 mL de DMEM preparado para bloquear la actividad enzimática. Esta suspensión era homogeneizada a través de aspiración y expulsión suave con pipeta y dividida en 3 frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup> y 1 frasco de 80cm<sup>2</sup>, que era considerado como el pase 0 (0P). Los frascos fueron revisados diariamente para observar el crecimiento celular y vigilar contaminación. Una vez que se lograba nuevamente la confluencia celular en el 80% de la superficie del frasco, se procedía nuevamente a despegar las células de la misma manera con solución de tripsina y de cada frasco de 25 cm<sup>2</sup> se obtenían 4 frascos de 25 cm<sup>2</sup> más y por cada frasco de 80 cm<sup>2</sup> se obtuvieron 2 frascos más del mismo tamaño considerando este pase como 1P. Este procedimiento se realizó hasta obtener 3 a 8 pases denominados con la letra P después del número de pase (3P a 8P); posteriormente se procedió a congelar las células para la realización de los experimentos en los FB<sup>[74]</sup>.

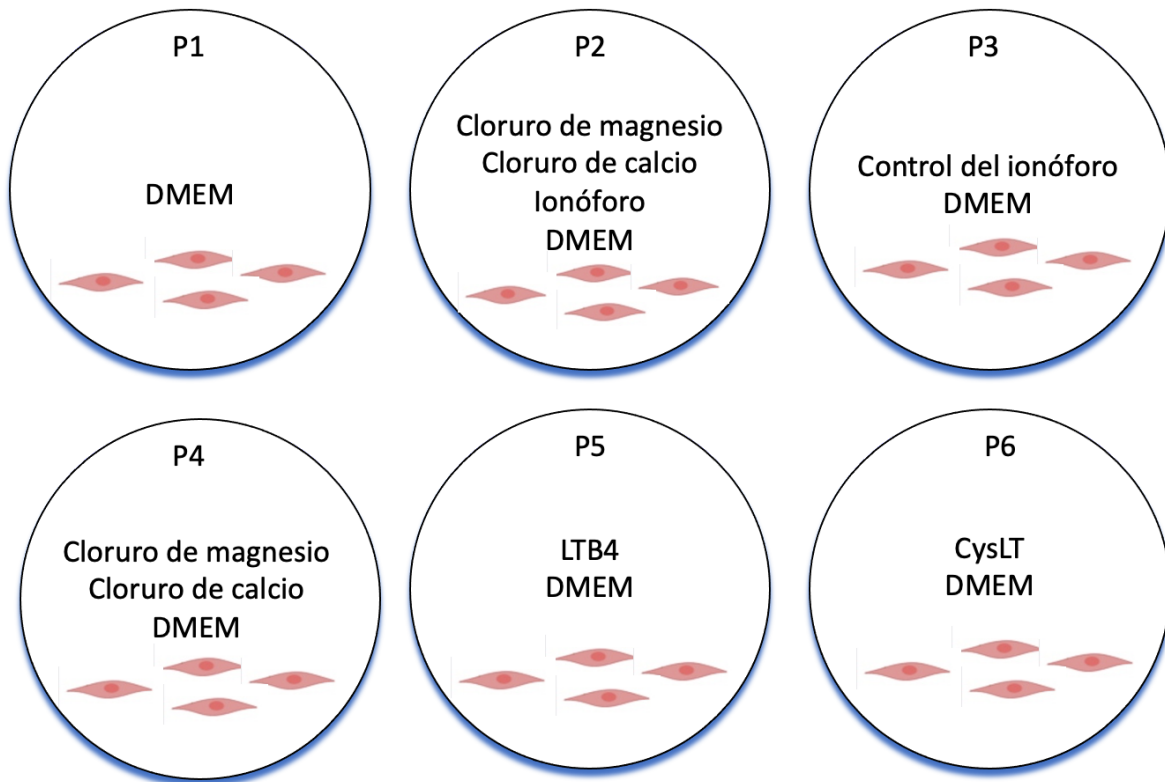
**Procedimiento para congelar las células.** Una vez que se obtuvo la confluencia celular en al menos 80% de los frascos, se realizaron los pases con el mismo procedimiento descrito. Esta suspensión era homogeneizada a través de aspiración y expulsión suave con pipeta y depositada en tubos de polipropileno de 15 mL (3 frascos de 25cm<sup>2</sup> por cada tubo), los cuales se centrifugaban a 800 x g a 4 °C por 15 minutos. El sobrenadante era desechado y la pastilla celular suspendida en medio 2mL de medio preparado: DMEM suplementado con FBS al 20%, estreptomycin/penicilina, anfotericina y HEPES al 1%, y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. La solución fue depositada en criotubos de 3mL y almacenada a -80 °C para su análisis posterior<sup>[74]</sup>.

**Identificación de las células de cultivo.** Se realizaron diluciones de las células en cultivo con el kit de Citología Base Líquida (Liquid PATH) para la preservación de las mismas y la realización de la técnica de hematoxilina/eosina (H&E) e inmunocitoquímica (ICQ); se obtuvieron sobrenadantes celulares de 500 µL (Solución Preservadora), de ésta se mezclaron 50 µL con 200 µL de solución encapsuladora (solución monocapa) para obtener los botones celulares de 50 µL cada uno para la realización de la tinción de H&E y la ICQ para vimentina y  $\alpha$ -SMA; estos botones celulares fueron fijados con acetona a 4 °C por 10 min. Se realizaron 2 botones celulares de cada uno, los primeros fueron utilizados para la interpretación histopatológica con H&E y los segundos para la inmunotinción empleando el sistema de detección de proteínas libres de Biotina EPOS/HRP (*Enhanced Polymer One Step/Horseradish Peroxidase*); para el desenmascaramiento de epítomos se utilizó Epitope Retrieval Solution 1X pH6 (Novocastra Leica Biosystem Newcastle Ltd., United Kingdom), para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena las muestras fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 0.9% en medio acuoso por 5 minutos, posteriormente las muestras se incubaron por 45 minutos con los anticuerpos anti-vimentina clona V9 y anti- $\alpha$ -SMA clona 1A4 (Biocare Medical, CA, USA). Posteriormente, los cortes histológicos se incubaron con el anticuerpo secundario y el conjugado HRP *Bond™ Polymer Refine Detection* por 10 minutos cada uno, (Leica Biosystems Newcastle Ltd., United Kingdom); para visualizar la reacción se utilizó como

sustrato 3,3'-deaminobencidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Biocare Medical, CA, USA) durante 5 minutos, misma que fue monitoreada al microscopio; el contraste se realizó con Hematoxilina de Gill y el viraje con solución de hidróxido de amonio al 0.37 M. Para la tinción H&E e ICQ, las piezas quirúrgicas fueron fijadas en formaldehído al 3.7 - 4.0 % amortiguado con buffer de fosfatos e incluidas en medio para tejido compuesto de parafina purificada y polímeros plásticos con pesos moleculares regulados, punto de fusión de 56° C, enriquecido con DMSO.

**Sobrenadantes de cultivo de fibroblastos.** Los FB provenientes de 5P a 7P, fueron transferidos a placas de 6 pozos (10<sup>5</sup> células/pozo) con DMEM preparado. En la Figura 3 se muestra el esquema de los tratamientos de los experimentos que se realizaron en un subgrupo de FB provenientes de 6 pacientes y 5 controles. Se tomaron los sobrenadantes de cultivo de manera basal (Pozo P1, 1000 µl DMEM). Se incubaron las células con ionóforo A23187 (calcimicina) por 24 horas con concentración final de 0.5µg/mL en presencia de 2 mM de CaCl<sub>2</sub> y 0.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (P2, ionóforo + iones); ionóforo sin iones(Calcimina a 0.5µg/mL) y con iones sin ionóforo (P4: 2 mM de CaCl<sub>2</sub> y 0.5 mM de MgCl<sub>2</sub>). Además, se incluyeron dos placas donde se estimularon a los FB por 24 horas con LTB<sub>4</sub> (P5: LTB<sub>4</sub> a 1nM) o con una mezcla a partes iguales de CysLT (P6: CysLT a 1nM) en estos pozos se agregó DMEM para obtener 1000 µL de solución final. Las placas se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y se recolectaron los sobrenadantes de cultivo en alícuotas de 200 µg en tubos de Eppendorf y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento para la determinación de los LT<sup>[4]</sup>.





**Figura 3.** Experimentos en los FB. Se muestran los tratamientos administrados a los FB, en cada pozo se sembraron  $1 \times 10^5$  FB. Se muestran los reactivos administrados en cada pozo. El control de ionóforo se refiere a una solución preparada con agua y etanol de la misma forma que se preparó el concentrado del ionóforo, pero sin el ionóforo. Se utilizó el ionóforo A23187 (Calcimicina) para la estimulación de los FB con una solución suplementada con iones cuando así se especifica. La concentración final del ionóforo en los pozos fue de  $0.5 \mu\text{g/ml}$ , de cloruro de magnesio  $0.5\text{mM}$ ; de calcio de  $2\text{mM}$ ; de LTB4 y de CysLT de  $1\text{nM}$ , se utilizó el medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) necesario para completar  $1000 \mu\text{l}$  de solución para cada pozo. Los sobrenadantes fueron utilizados para la cuantificación de LTC4 y las células fueron utilizadas para los análisis de RT-QPCR para los genes COL1A1, COL3A1, CTGF, TGF $\beta$ 1, CYSLTR1, CYSLTR2, LTB1, GAPDH y ACTB. FB: fibroblastos, LT: leucotrieno, RT-QPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.

En un segundo experimento, los FB provenientes de 3 controles fueron incubados por 24 horas con suero proveniente de pacientes y con suero autólogo, las células se utilizaron para la extracción de RNA y los sobrenadantes para la cuantificación de LTC4.

**Extracción de RNA.** La extracción del RNA se realizó usando  $1\text{mL}$  de TriPure reagent (ROCHE, Sciences, Maryland, USA) por cada  $10^5$  células de cultivo de cada pozo, se administró tratamiento con DNasa usando la DNasa I

recombinante (ROCHE, Science, Maryland, USA). La integridad del ARN constitutivo (RNA 18S y 28S) se evaluó en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. La pureza y cuantificación fueron evaluados en un espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific Lafayette, CO, USA). Para el análisis de la expresión de mRNA se obtuvo el cDNA por el método de la transcriptasa inversa, para la reacción se utilizó 1 µg de RNA y se mezcló con hexámeros al azar y el kit *transcriptor first strand cDNA synthesis* (Roche, Sciences, Maryland, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### **Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-QPCR).**

Se realizó la reacción de PCR cuantitativa usando sondas para cada gen blanco y los genes de referencia utilizando el software ProbeFinder versión 2.4 en combinación con las sondas LNA de la *Universal ProbeLibrary Sigma-Aldrich*. Se amplificó 1 µL de cDNA con 400 nM de cada sonda (Sigma-Aldrich Life Science, Texas, USA), 100 nM de UPL probe (ROCHE, Reuskeutz, Suiza), el *LighCycler TaqMan Master* (ROCHE, Sciences, Maryland, USA) seguido de 45 ciclos a 95° 10 s, 60° 30 segundos y 72° 1 s en un termociclador de tiempo real con el equipo LightCycler 2.0 (ROCHE, Reuskeutz, Suiza). La cuantificación relativa del mRNA de los genes blanco se realizó usando ACTB y GADPH como genes de referencia y el método de 2-ΔCt. Las secuencias sentido y antisentido de los oligonucleótidos utilizados para la RT-QPCR fueron para la COL1A1 5'-gggattccctggacctaag-3' y 5'-ggaacacctcgctctcca-3'; COL3A1 5'-ctggaccccagggtcttc-3' y 5'-gaccatctgatccagggtttc-3'; CTGF 5'- cctgcaggctagagaagcag-3' y 5'-tgagattttgggagtagcg-3'; CYSLTR1 5'- actccagtgccagaaagagg-3 y 5'-gcggaagtcataatagtgtca-3'; CYSLTR2 5'- ctagagtcctgtgggctgaaa-3' y 5'-gtaggatccaatgtgctttgc-3'; LTB4R 5'- gactccaacttctgccaat-3' y 5'-aggaaggcatcccctagaac-3'.

#### **Definiciones operacionales**

*Esclerosis sistémica limitada (ESL)*: se caracteriza por engrosamiento cutáneo de la parte distal de las extremidades (más allá de los codos y las rodillas) y la cara<sup>[21]</sup>.

*Esclerosis sistémica difusa (ESD)*: se caracteriza por engrosamiento cutáneo que afecta tronco (tórax o abdomen), extremidades, cara y cuello<sup>[21]</sup>.

*Afección vascular*: presencia de FR, UD o cicatrices puntiformes. Patrones de esclerodermia por capilaroscopia: *patrón temprano*: dilatación de capilares, hemorragias capilares; *patrón activo*: alteración en la distribución de capilares y disminución moderada en el número de capilares, *patrón tardío*: neovascularización con capilares ramificados y alteración grave de la anatomía capilar<sup>[75,76]</sup>.

*Tratamiento inmunosupresor*: medicamentos que refirió estar utilizando el paciente al momento de la historia clínica para el tratamiento de la ES que incluyeron: metotrexato, ácido micofenólico o micofenolato de mofetilo, azatioprina o glucocorticoides<sup>[77]</sup>.

### **Descripción de variables**

**Variables dependientes**: LTB<sub>4</sub>, CysLT en plasma y saliva, LTC<sub>4</sub> en sobrenadante de cultivos, IL-10 y TGF- $\beta$  en suero; expresión de mRNA en cultivos de FB pre-estimulación y pos-estimulación.

**Variables independientes**: edad, género, grupo (ES, control), variedad clínica, manifestaciones vasculares: FR (historia o a la exploración), UD (historia o al examen físico), cicatrices digitales puntiformes (historia o examen físico), anomalías capilaroscópicas (pérdida de capilares, tamaño de los capilares (normal, ectasia o gigante) y patrón de esclerodermia.

**Covariables**: edad y tratamiento.

### **Cálculo del tamaño de muestra**

Basado en estudios previos<sup>[4,39,49]</sup> para encontrar una diferencia de 1.3 pg/mL de LTB<sub>4</sub> entre ambos grupos en los sobrenadantes de cultivos de FB se requieren 34 individuos, para encontrar una diferencia de 30pg/mL en orina se requieren 16 individuos y para encontrar una diferencia de 100pg/dL de LTB<sub>4</sub> se requieren 46 individuos, por lo que se calculó una muestra de 46 individuos, 23 pacientes y 23

controles, con una potencia de 0.8 y un error  $\alpha$  de 0.05. Se calculó el tamaño de muestra con el paquete estadístico JMP versión 9.0 (SAS Institute Inc).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las características demográficas y clínicas, así como los resultados de los exámenes de laboratorio de las pacientes y, cuando aplicó, de los controles, se reportan como promedio  $\pm$  error estándar de la media o como número (%).

Las asociaciones entre los grupos participantes y los LT y los hallazgos clínicos fueron analizados a través del análisis de covarianza (ANCOVA), incluyendo la edad como covariable. Se usó el siguiente procedimiento para la generación de los modelos. Primero se realizó un modelo ANCOVA donde se incluyeron los grupos participantes, la variable explicatoria y la edad como covariable, y el producto de los dos como término de interacción para cada una de las variables y su respectivo desenlace; segundo, la suposición de suficiencia del modelo de ANCOVA fue analizada a través de la prueba de bondad de ajuste de los residuos estudentizados para determinar si ajustaban a la distribución normal. Si la suposición era satisfecha, el modelo de ANCOVA fue sujeto al procedimiento de la selección de variables en un procedimiento de paso a paso hacia atrás. En el caso de que la suposición no hubiera sido compatible con la distribución normal, se realizó la transformación de Box-Cox a la variable de desenlace. Después de estos pasos, si el efecto de la variable explicatoria, en los grupos analizados, fue significativa, se utilizó la prueba de honestidad de Tukey (HSD) para encontrar las diferencias entre los grupos. Para todas las pruebas, el valor de significancia estadístico se estableció con una  $p < 0.05$ .

Se usó la corrección secuencia de Holm-Bonferroni para proteger contra el error de tipo I. Las correlaciones entre las variables cuantitativas se evaluaron usando la prueba de rango de Spearman.

El análisis de los datos se llevó a cabo con el software JMP version 13.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) y la calculadora de Excel en su version 1.2 (2013) para el cálculo de la corrección secuencial de Holm-Bonferroni<sup>[78]</sup>.

## Consideraciones éticas

Este estudio transversal se realizó de acuerdo con las guías de la Declaración de Helsinki y las regulaciones nacionales, se siguieron las regulaciones éticas para el diseño del estudio y los procedimientos para la protección de los sujetos incluidos en el estudio. El protocolo fue aprobado por la comisión de Investigación y de ética del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (IRB: 12-776). Se obtuvo el consentimiento informado de todas las mujeres que aceptaron participar en el estudio.

## RESULTADOS

Se reclutaron 20 pacientes (12 con ESL y 8 con ESD) y 16 voluntarias sanas, sus manifestaciones clínicas y las manifestaciones vasculares se muestran en la Tabla 2. El promedio de edad de las sanas fue significativamente menor comparado con el de las pacientes (prueba de  $t$   $p < 0.01$ ), por lo que en todas las pruebas se generaron modelos de ANCOVA para el manejo de la edad como covariable; sólo se reportan las diferencias que fueron significativas.

Se incluyeron sólo pacientes femeninas en el estudio debido a que el único paciente masculino se negó a participar en el estudio. Dos muestras de saliva fueron insuficientes para medir la concentración de CysLT y LTB<sub>4</sub>, a pesar de que a las pacientes se les estimuló con goma de parafina. Solo tres de 20 pacientes y una de 16 voluntarias sanas requirió hacer una prueba estimulada para obtener una muestra adecuada de saliva.

**Tabla 2.** Características de base de la población de estudio.

<b>Variable</b>	<b>ES</b>	<b>Controles</b>
Edad, promedio (rango), años	48.9 (18-61)	36.8 (20-69)
IMC Kg/m <sup>2</sup> , promedio	24.4	23.6
Sexo, mujeres/hombres <i>n</i>	20/0	16/0
Historia de tabaquismo, <i>n</i>	1	1
Duración de la enfermedad desde el diagnóstico, años (rango)	6.64 (0-27)	-
TSS, promedio (rango)	14.4 (2-41)	0
ESD, ESL, <i>n</i> , <i>n</i>	8, 12	0
Historia de FR, <i>n</i>	19	0
FR a la exploración física, <i>n</i>	15	0
Historia de UD, <i>n</i>	6	0
Cicatrices puntiformes digitales, <i>n</i>	13	0
EPI, <i>n</i>	3	-
Manifestaciones GI, <i>n</i>	20	-
Manifestaciones articulares		
Artritis, <i>n</i>	5	-
Síndrome del túnel del carpo, <i>n</i>	3	-
Contractura por FTP, <i>n</i>	10	-
Leve (1-1.9 cm), <i>n</i>	3	-
Moderada (2-3.9 cm), <i>n</i>	6	-
Grave (4-4.9 cm), <i>n</i>	0	-
Estadio terminal, <i>n</i>	1	-
AAN, <i>n</i>	20	-
Topoisomerasa-I, <i>n</i>	4	-
ACA, <i>n</i>	11	-
Tratamiento		-
Ácido micofenólico, <i>n</i> (rango de la dosis)	8 (0.5-2 g)	
Metotrexato, <i>n</i> (rango de la dosis)	6 (12.5-15 mg)	
Prednisona, <i>n</i> (rango de la dosis)	2 (10-15 mg)	
Nifedipino, <i>n</i>	7	
Bloqueadores del receptor de angiotensina, <i>n</i>	3	
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	3	
Ácido acetilsalicílico, <i>n</i>	2 (100 mg)	
Capilaroscopia, patrón de esclerodermia, <i>n</i>		

Temprano	5	0
Activo	10	0
Tardío	5	0

El grupo control incluyó voluntarias sanas, quienes no estaban tomando tratamiento alguno; no se les realizaron las pruebas inmunológicas de anticuerpos, los autoanticuerpos del grupo de las pacientes fueron obtenidos del expediente clínico. ES: esclerosis sistémica, ESD: esclerosis sistémica difusa, ESL: esclerosis sistémica limitada; IMC: índice de masa corporal; TSS: puntaje cutáneo total modificado de Rodnan; EPI: enfermedad pulmonar intersticial; AAN: anticuerpos antinucleares; ACA: anticuerpos anti-centrómero, FTP: distancia del 3er dedo al pliegue palmar.

**Niveles de LT entre los grupos.** Los niveles de LTB4 y CysLT en las muestras de saliva y plasma no mostraron una distribución normal, por lo que se realizó la transformación de Box-Cox de las variables y se corroboró que se ajustaron a la distribución normal, a través de la prueba de bondad de ajuste a los residuos estudentizados. Las comparaciones entre los grupos se realizaron con las variables transformadas. Se encontraron concentraciones más elevadas de CysLT en saliva en el grupo de ES ( $105.4 \pm 22$  pg/mL) comparadas con las del grupo control ( $23 \pm 23.3$  pg/mL); se encontró un patrón similar en el plasma (pacientes  $68.9 \pm 11$  pg/mL, controles  $32.3 \pm 12.4$  pg/mL). De igual forma las concentraciones de LTB4 en saliva también fueron más elevadas en el grupo de pacientes ( $2479.5 \pm 388.4$  pg/mL) que en el grupo control ( $1216.3 \pm 412$  pg/mL), pero las diferencias no alcanzaron significancia estadística con la corrección de Holm-Bonferroni. No se encontró diferencia significativa entre las pacientes y las mujeres control para los niveles de LTB4 en plasma (ES  $306.9 \pm 27.9$ , controles  $318.7 \pm 31.1$ ). Los niveles de LT también se compararon entre los subgrupos, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas, ni tampoco para el TGF- $\beta$ 1.

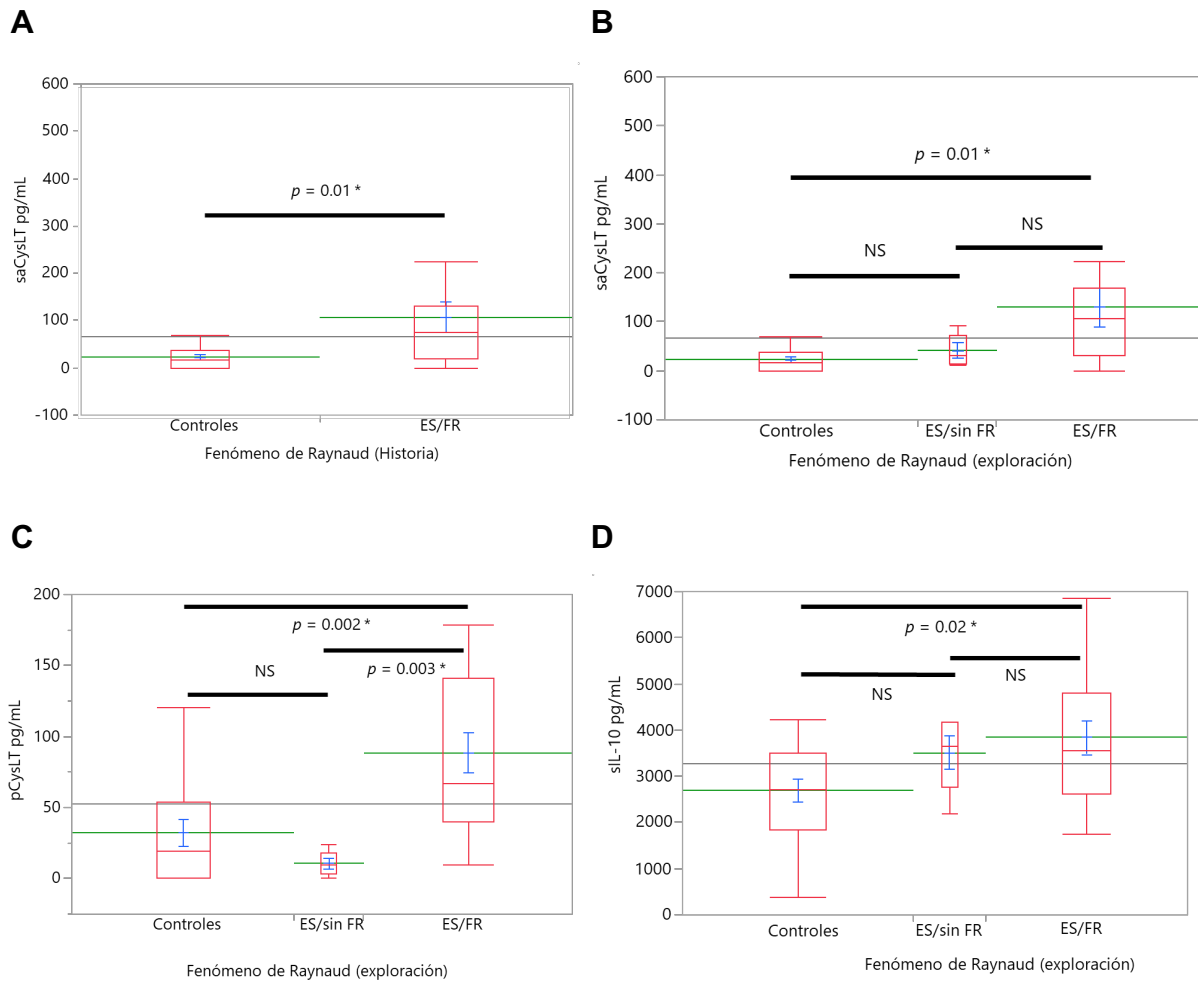
**Niveles de citocinas en suero entre los grupos.** Los niveles de TGF- $\beta$ 1 no mostraron una distribución normal, por lo que las comparaciones entre los grupos se realizaron con la variable transformada de Box-Cox. La concentración de TGF- $\beta$ 1 en suero de las pacientes con ES fue más alta ( $1836.3 \pm 592.3$  pg/mL,  $n=20$ ) que en los controles ( $378 \pm 662.2$  pg/mL,  $n=16$ ), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.05$ ). Los niveles de IL-10 mostraron compatibilidad con la distribución normal; las concentraciones de IL-10 en suero fueron más elevadas en el grupo de pacientes ( $3761.9 \pm 248.4$  pg/mL,  $n=20$ )

comparado con el grupo control ( $2704.7 \pm 277.7$  pg/mL,  $n=16$ ;  $t = 2.83$ , GL:1,35  $p=0.007$ ), con una diferencia estadísticamente significativa en la prueba de  $t$ .

*LT y anormalidades vasculares.* Las pacientes con historia de FR mostraron niveles más elevados de CysLT en saliva ( $99.4 \pm 21.8$  pg/mL) comparado con los controles ( $23.05 \pm 23.7$  pg/mL,  $n = 16$ ),  $F (1,32) = 6.33$ , (Figura 4A). Una paciente carecía de historia de FR por lo que fue excluida del análisis estadístico. Como se mencionó, dos muestras de saliva fueron insuficientes para medir los niveles de CysLT y LTB4 ( $n = 17$ ). Las pacientes con ES con FR al momento de la exploración física mostraron niveles más elevados de CysLT en saliva ( $129.3 \pm 24.6$  pg/mL,  $n = 13$ ) comparados con los de las mujeres del grupo control ( $23.05 \pm 22.46$ ,  $n = 16$ ), pero no comparado con las pacientes sin FR a la exploración ( $41.35 \pm 40.2$  pg/mL,  $n = 5$ ),  $F (2,33) = 5.31$  (Figura 4B). La misma tendencia se encontró en los niveles plasmáticos de CysLT, las pacientes con FR en la exploración física ( $87.5 \pm 11.2$  pg/mL,  $n = 15$ ), comparado con las pacientes con ES sin FR a la exploración ( $10.73 \pm 19.24$  pg/mL,  $n = 5$  Figura 4C) y las mujeres del grupo control ( $32.37 \pm 10.75$ ,  $n = 16$ ),  $F (2,33) = 5.31$ ; todas las muestras de plasma pudieron ser analizadas para los niveles de CysLT y LTB4.

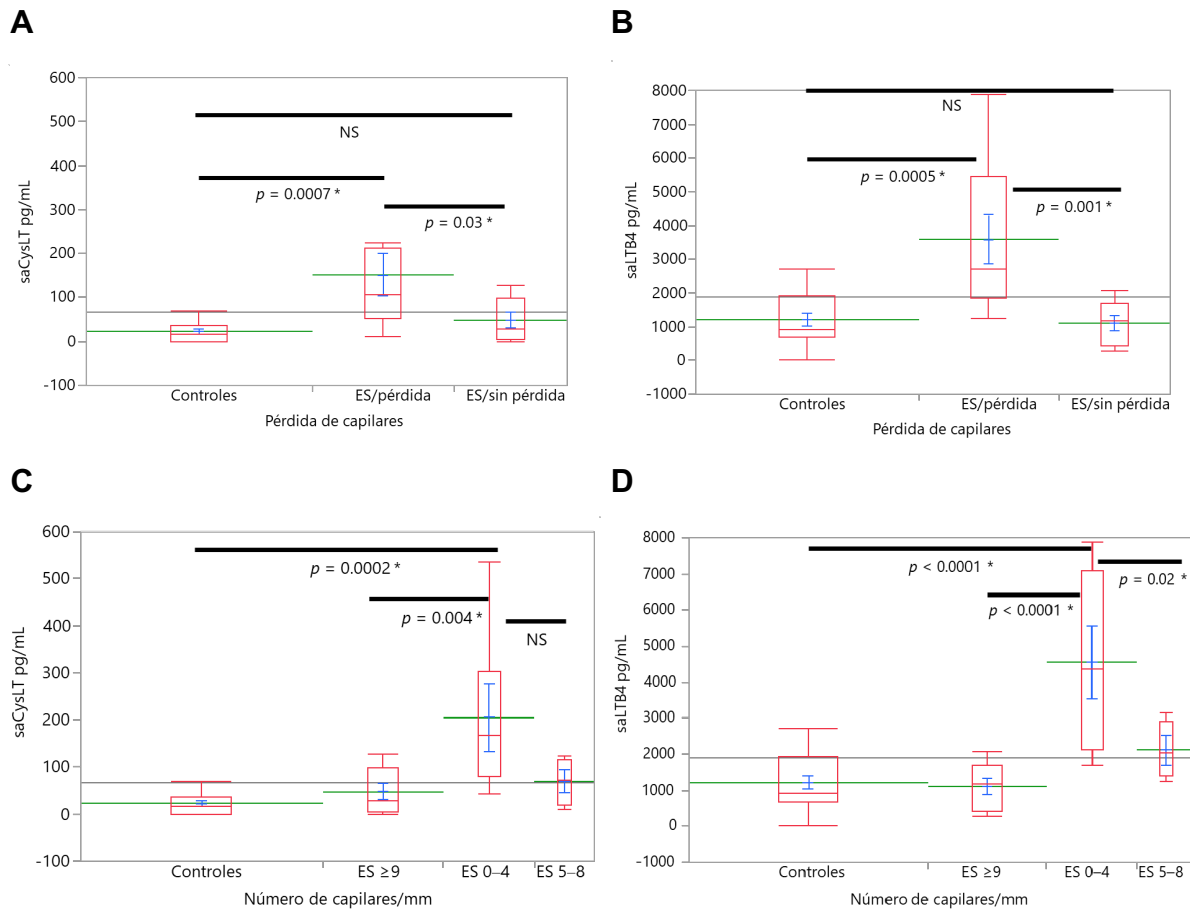
*Citoquinas y anormalidades vasculares.* La presencia de FR a la exploración física en las pacientes con ES se asoció con concentraciones más elevadas de IL-10 en el suero ( $3846.8 \pm 289.6$ ,  $n=15$ ) comparado con las sanas ( $2704.7 \pm 280.4$  pg/mL,  $n=16$ ),  $F (2,33) = 3.87$ ; no hubo diferencias significativas con respecto a las pacientes con ES sin FR (Figura 4D). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto a los niveles de TGF- $\beta$ 1.





**Figura 4.** Niveles de LT y manifestaciones vasculares. Se muestran las diferencias en los niveles de leucotrienos de acuerdo con la presencia o ausencia de las manifestaciones vasculares que mostraron diferencias estadísticamente significativas. Se muestran las gráficas de caja y bigotes (rojo), promedio (verde), barras del error de la media (azul) y la media general (línea gris entre las cajas). El eje X es proporcional. Se muestran las diferencias significativas entre los grupos con barras. Niveles de CysLT en saliva en pacientes con ES con historia de FR comparado con el grupo control, para este análisis se utilizó la prueba de Wilcoxon (A). Comparación entre los niveles saCysLT entre los grupos con ES con (ES/FR) y sin (ES/no FR) FR en la exploración física, y el grupo control (B). Comparación entre los niveles pCysLT (C) y los niveles de IL-10 en suero (D) entre los grupos con y sin FR a la exploración y con el grupo control. Se utilizó el análisis de covianza (ANCOVA) para los análisis y la prueba de Tukey HSD para detectar las diferencias entre los pares. FR: Fenómeno de Raynaud, LT: leucotrienos, CysLT: cisteinil-leucotrienos, sa: salivales, p: plasmáticos, s: suero, NS: no significativo, \*: para mostrar las pruebas estadísticamente significativas.

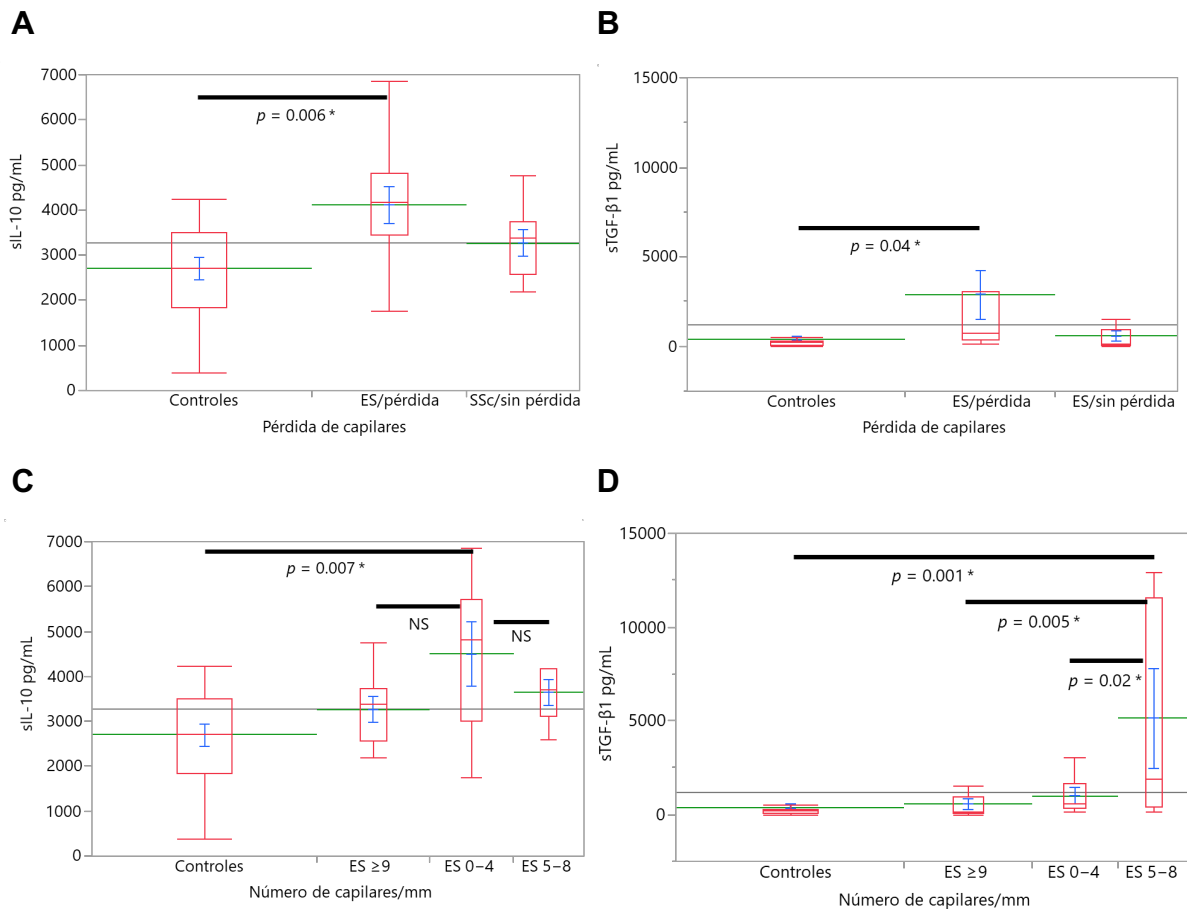
*LT y anormalidades de la NFC. Pérdida de capilares.* Los niveles de CysLT salival fueron más elevados ( $138.6 \pm 26.7$  pg/mL,  $n = 11$ ) en el grupo de pacientes con ES que tuvo pérdida de capilares comparado con las pacientes con ES sin pérdida de capilares ( $37.96 \pm 30.5$  pg/mL,  $n = 7$ ) y las mujeres del grupo control ( $23 \pm 21.6$  pg/mL,  $n = 16$ ),  $F(2,33) = 7.0$  (Figura 5A). Esta tendencia también se observó para los niveles de LTB4 en saliva, las pacientes con ES y pérdida de capilares ( $3380.9 \pm 426.6$  pg/mL) tuvieron niveles significativamente más altos que las pacientes con ES sin pérdida de capilares ( $1097.12 \pm 489.45$ ) y las sanas ( $1216.33 \pm 346.1$  pg/mL),  $F(2,33) = 10.7$  (Figura 5B). Cuando los grupos se estratificaron por el número de capilares, el grupo con la mayor pérdida de capilares (0-4 capilares/mm,  $n = 7$ ) tuvo los niveles más altos de CysLT en saliva ( $177.8 \pm 32$  pg/mL) comparado con el grupo con ES sin pérdida de capilares ( $47.96 \pm 27.93$  pg/mL) y los controles, quienes mostraron niveles de CysLT salivales de  $23.05 \pm 19.75$  pg/mL,  $F(3,33) = 7.97$  (Figura 5C). Esta tendencia fue similar para el LTB4 salival. Los niveles de LTB4 estuvieron más elevados en el grupo con 0-4 capilares/mm ( $4103.4 \pm 498.9$  pg/mL) comparado con las pacientes con ES con una menor pérdida de capilares (LTB4  $2116.45 \pm 612.54$  pg/mL) y las pacientes con ES sin pérdida de capilares ( $1097.12 \pm 433.13$ ) y los controles ( $1216.33 \pm 306.27$ ),  $F(3,33) = 12.3$  (Figura 5D). Con respecto al tamaño de los capilares, tres pacientes mostraron una pérdida grave de los capilares, por lo tanto, no se pudo medir el diámetro capilar. El grupo con capilares gigantes ( $n = 9$ ) tuvo los niveles más altos de LTB4 en saliva ( $2592.3 \pm 293.7$ ) comparado con el grupo de pacientes con ES con ectasia capilar ( $919.8 \pm 508.7$ ) y las mujeres control ( $1135.5 \pm 202.1$ ),  $F(3,30) = 8.98$ ; capilares gigantes versus ectasia ( $p = 0.001$ ) y capilares gigantes versus controles ( $p = 0.01$ ). Sin embargo, en este caso el modelo de ANCOVA fue también significativo para la edad ( $p = 0.03$ ). Las pacientes con ES con capilares dilatados mostraron niveles más elevados de LTB4 salival que las mujeres sanas controles ( $p = 0.04$ ).



**Figura 5.** Niveles de LT y hallazgos en la NFC. Los niveles de LT se asociaron con las anomalías de la capilaroscopia ungueal. Se muestran las gráficas de caja y bigotes (rojo), promedio (verde), barras del error de la media (azul) y media general (línea gris entre las cajas). Se muestran las diferencias significativas entre los grupos a través de barras. El eje X es proporcional. Los niveles salivales de CysLT (A) y LTB4 (B) estuvieron más elevados en el grupo de ES con pérdida de capilares comparado con el grupo de ES sin pérdida de capilares y el grupo control (número de capilares  $\geq 9$  por milímetro). Los niveles salivales de CysLT (C) y LTB4 (D) estuvieron más elevados en el grupo con capilares entre 0-4 por milímetro comparado con el grupo con ES con número normal de capilares ( $\geq 9$  capilares/milímetro) y el grupo control. Asimismo, los niveles salivales de LTB4 fueron mayores comparados con el grupo que mostró entre 5-8 capilares/mm. Se utilizó el análisis de covarianza (ANCOVA) para los análisis y la prueba de Tukey HSD para detectar las diferencias entre los pares. ES: esclerosis sistémica, LT: leucotrienos, saCysLT: cisteinil-leucotrienos salivales, saLTB4: leucotrieno B4 salival, NFC: capilaroscopia del lecho ungueal, NS: no significativo, \*: señala las diferencias estadísticamente significativas.

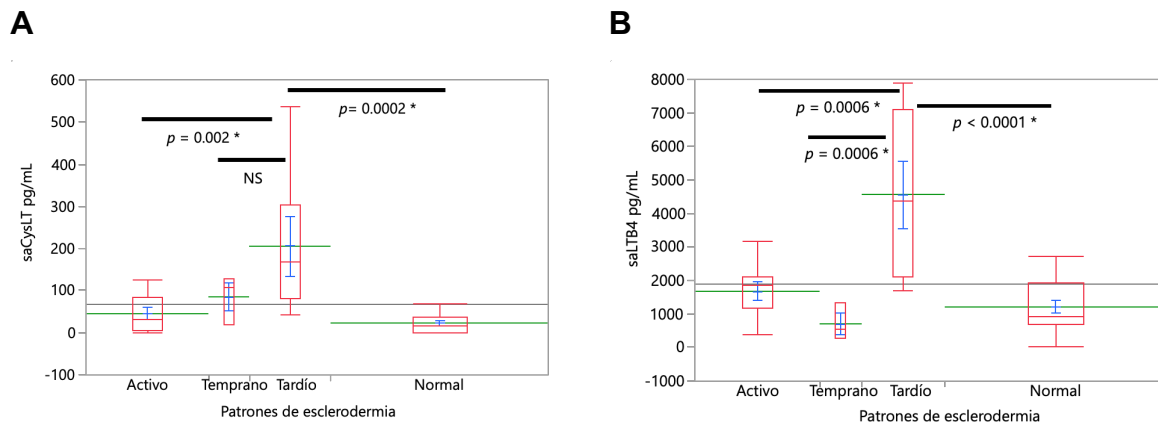
*Citoquinas y anormalidades en la NFC.* Los niveles de IL-10 se encontraron más elevados en el grupo de ES con pérdida de capilares ( $4117.2 \pm 327.2$  pg/mL), comparado con el grupo control ( $2704.7 \pm 271.3$  pg/mL) pero no hubo diferencias con el grupo de pacientes sin pérdida de capilares ( $3327.5 \pm 361.8$  pg/mL),  $F(2,35) = 5.52$  (Figura 6A). Cuando se clasificó de acuerdo con el número de capilares, el grupo de ES con número de capilares entre 0-4 fue el que presentó las concentraciones más elevadas de IL-10 ( $4505.5 \pm 438.3$  pg/mL) comparado con el grupo control ( $2704.7 \pm 268.4$  pg/mL)  $F(3,35) = 4.34$  (Figura 6C). No hubo otras diferencias significativas entre los grupos. Asimismo, el grupo de ES con dilatación capilar ( $3893.5 \pm 305.3$  pg/mL) tuvo niveles más elevados de IL-10 comparado con el grupo control ( $2704.7 \pm 275.2$  pg/mL)  $F(2,32) = 4.43$ ; y cuando se clasificó a las pacientes de acuerdo al tamaño capilar, el grupo de ES con capilares gigantes presentó mayores niveles de IL-10 en suero ( $4303.9 \pm 347$  pg/mL) comparado con el grupo control ( $2704.7 \pm 260.3$  pg/mL),  $F(3,32) = 4.82$ ; a diferencia de lo observado para el LTB4 en saliva, para el caso de la IL-10 no hubo un efecto significativo de la edad.

Los niveles de TGF- $\beta$ 1 estuvieron más elevados en el grupo de ES que presentó pérdida de capilares ( $2874.1 \pm 764.6$  pg/mL) comparados con los del grupo control ( $378 \pm 634$  pg/mL) y con el grupo de ES sin pérdida de capilares,  $F(2,35) = 5.65$  (Figura 6B). Cuando se comparó a los grupos por el número de capilares, el grupo con pérdida moderada, es decir, con 5-8 capilares/mm ( $5151 \pm 1014$  pg/mL,  $n=5$ ) presentó los niveles más elevados comparado con las mujeres del grupo control ( $378 \pm 567.2$  pg/mL), con el grupo de ES sin pérdida de capilares ( $567.9 \pm 756.3$  pg/mL,  $n = 9$ ) y con el grupo de pérdida grave, es decir, entre 0-4 capilares/mm ( $976.8 \pm 926.3$ ,  $n = 6$ ),  $F(3,35) = 6$  (Figura 6D). No se encontraron otras diferencias significativas para los grupos.



**Figura 6.** Niveles de citoquinas y hallazgos en la NFC. Los niveles de IL-10 y TGF-β1 se asociaron con las anomalías de la capilaroscopia ungueal. Se muestran las gráficas de caja y bigotes (rojo), promedio (verde), barras del error de la media (azul) y media general (línea gris entre las cajas). Se muestran las diferencias significativas entre los grupos a través de barras. El eje X es proporcional. Los niveles séricos de IL-10 (A) y TGF-β1 (B) estuvieron más elevados en el grupo de ES con pérdida de capilares comparado con el grupo de ES sin pérdida de capilares y el grupo control (número de capilares  $\geq 9$  por milímetro). Los niveles de IL-10 estuvieron más elevados en el grupo con capilares entre 0-4 por milímetro comparado con el grupo control (C). Los niveles de TGF-β fueron mayores en el grupo que mostró entre 5-8 capilares/mm comparado con los controles, el grupo de pacientes sin pérdida de capilares y el grupo con pérdida grave (D). Se utilizó el análisis de covarianza (ANCOVA) para los análisis y la prueba de Tukey HSD para detectar las diferencias entre los pares. ES: esclerosis sistémica, s: suero, LT: leucotrienos, saCysLT: cisteinil-leucotrienos salivales, saLTB4: leucotrieno B4 salival, NFC: capilaroscopia del lecho ungueal, NS: no significativo, \*: señala las diferencias estadísticamente significativas.

*Patrones de esclerodermia.* Las pacientes con el patrón tardío ( $n = 6$ ) tuvieron niveles salivales de CysLT ( $205.6 \pm 32$  pg/mL, Figura 7A)  $F(3,33) = 8.18$  y salivales de LTB4 ( $4564.9 \pm 503.6$  pg/mL, Figura 7B) más elevados comparados con la capilaroscopia normal de las voluntarias sanas ( $n = 16$ ), (saliva: CysLT  $23 \pm 19.6$  pg/mL, LTB4  $1216.3 \pm 308.3$  pg/mL) y comparados con el patrón activo (saliva: CysLT  $45.49 \pm 26.18$  pg/mL, LTB4  $1681 \pm 411.18$ ,  $n = 9$ ). Además, los niveles de LTB4 fueron más altos en pacientes con patrón tardío que el patrón temprano ( $n = 3$ , saliva: LTB4  $704.4 \pm 712.1$  pg/mL, Figura 4B)  $F(3,33) = 8.18$ . No hubo diferencias entre los grupos por edad o por índice de masa corporal. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos con respecto a los niveles de IL-10 y TGF- $\beta$ 1.

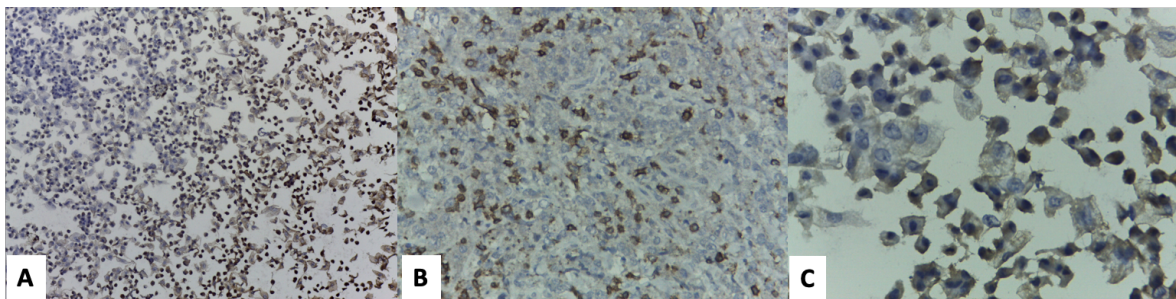


**Figura 7.** Niveles de LT y patrones de esclerodermia en la capilaroscopia. Los niveles de leucotrienos se asociaron con los patrones de esclerodermia. Se muestran las gráficas de barras y bigotes (rojo), promedio (verde), barras de error de la media (azul) y media general (línea gris entre las gráficas de caja). Las diferencias significativas entre los grupos se muestran con barras. El eje de las X es proporcional. Niveles salivales de CysLT (A) y LTB4 (B) estuvieron más elevados en el grupo con patrón “tardío” comparado con la capilaroscopia normal y el patrón activo. Asimismo, los niveles salivales de LTB4 en el patrón “tardío” fueron más elevados que en el patrón “temprano”. Se utilizó el análisis de covarianza (ANCOVA) y la prueba de Tukey HSD para detectar las diferencias entre los pares. saCysLT: cisteinil-leucotrienos salivales, saLTB4: leucotrieno B4 salival.

*Correlaciones entre LT y variables demográficas.* No se encontraron correlaciones entre los LT y la edad o el índice de masa corporal. *Correlaciones entre los LT.*

Los niveles salivales de LTB4 y CysLT en saliva mostraron una correlación positiva ( $\rho$  of Spearman 0.51,  $p = 0.001$ ), no se encontraron otras correlaciones significativas entre los LT. Correlaciones entre los LT y la NFC. Los niveles de CysLT se correlacionaron de manera negativa con el número de capilares ( $\rho$  de Spearman 0.61,  $p < 0.0001$ ). Las correlaciones con las citoquinas no alcanzaron significancia estadística con la corrección de Holm-Bonferroni.

Respecto a los estudios realizados con las células obtenidas de la piel de pacientes y controles, se realizó la identificación de las células de cultivo ( $n = 2$ ) de un paciente y un control. La tinción de H&E identificó a las células como fibroblastos. La ICQ de ambas muestras mostró anticuerpos positivos anti- $\alpha$ -SMA positivos dilución 1:50 en un 50% de las células en ambos casos y anticuerpos anti-vimentina positivos, dilución 1:100 (Figura 8).



**Figura 8.** Inmunocitoquímica. Se muestra una muestra de ICQ realizada a los fibroblastos en cultivo de un paciente con ES por microscopía de luz 10x(A), 40x'(B) y 100x'(C). Los fibroblastos fueron anti-vimentina y anti- $\alpha$ -SMA positivos. SMA: actina del músculo liso, ES: esclerosis sistémica, ICQ: inmunocitoquímica.

**Experimentos en los FB.** La determinación de LTC4 en todos los pozos de los experimentos tanto de controles ( $n = 6$ ) como de pacientes ( $n = 7$ ), de manera basal, con estimulación con ionóforo y con estimulación con LTB4 y LTC4 por 24 horas, se reportó por debajo del límite de sensibilidad del EIA. La cuantificación de LTC4 en los pozos de células de controles estimulados con suero de paciente y con suero autólogo también se reportó por debajo del límite de sensibilidad del estudio en todos los pozos.

La expresión de CYSLTR1, CYSLTR2 y LTB1 se encontró tanto en las células de cultivo de pacientes como la de los controles, pero su expresión fue baja en comparación con la expresión de TGF- $\beta$ 1, COL1A1 y COL3A1.

No se encontraron diferencias entre la expresión de mRNA de CYSLTR2, LTB1, COL3A1, COLA1, CTGF, TGFB1 en las células de cultivo provenientes de pacientes comparada con los controles, ni de manera basal ni tras la estimulación. Tampoco hubo diferencias en las células de cultivo de controles estimuladas con suero de pacientes comparado con las células incubadas con suero autólogo.

## **DISCUSIÓN**

En este trabajo se investigó la posible relación entre los niveles de los LT en líquidos corporales con las manifestaciones vasculares de la ES teniendo como base las funciones biológicas que desempeñan los LT en la inflamación, la función vascular y la fibrosis. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos con respecto a los LT, considerando la relación entre los LT y las funciones vasculares, se encontraron concentraciones más elevadas de LT en pacientes con ES que tenían manifestaciones vasculares. Los niveles plasmáticos y salivales del CysLT estuvieron más elevados en las pacientes con FR, los niveles más elevados tanto de CysLT como de LTB4 estuvieron asociados con la pérdida de capilares y el patrón de esclerodermia tardío. Asimismo, los niveles más elevados de LTB4 se asociaron con la presencia de capilares gigantes y con capilares dilatados. Estas características son causadas por la hipoxia tisular, uno de los mecanismos patogénicos de la ES. Esto sugiere que podrían estar relacionados con la síntesis de LT ya que esto es consistente con las actividades biológicas reportadas de los LT<sup>[17,28,29,34,79,80]</sup>. Son pocos los estudios que se han enfocado en la potencial asociación entre el FR y los LT. Lau y colaboradores<sup>[81]</sup> investigaron la posible relación entre las propiedades inflamatorias del LTB4 y el FR en pacientes con ES y en pacientes con “síndrome blanco” inducido por vibración y encontraron un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) pero también de LTB4 al estimular polimorfonucleares obtenidos de sangre periférica comparado con controles



sanos. En otro estudio Azevedo et al.<sup>[82]</sup> valoraron el efecto del montelukast, un antagonista del receptor CysLTR<sub>1</sub>, en las alteraciones de la NFC en pacientes con FR. Estos autores encontraron que la terapia anti-leucotrieno se asoció con una reducción del edema y la palidez, así como una normalización del número de los capilares, su tamaño y su distribución. Sin embargo, no hay otros estudios que hayan investigado la relación entre las anomalías vasculares y los LT, a pesar de que por sus actividades biológicas participan en la función vascular. Sin embargo, hay varios estudios que han investigado la relación de los LT con enfermedades que cursan con hipoxia en otros contextos. Entre ellos se ha encontrado una producción incrementada de los LT en relación con gravedad de la desaturación de oxígeno nocturna y de la hipoxia intermitente en pacientes con síndrome de apnea obstructiva del sueño<sup>[83,84]</sup>. Resultados de estudios en modelos animales han mostrado que los LT podrían potenciar la respuesta vasoconstrictora aguda y sostenida de los vasos pulmonares a la hipoxia y que esto podría estar relacionado con el desarrollo de hipertensión pulmonar asociada a la hipoxia crónica<sup>[85]</sup>. Además, se ha postulado que la hipoxia intermitente estimula la síntesis de LT y de moléculas proinflamatorias derivadas de la vía de la 5-LO y que esto podría conducir a aterosclerosis, isquemia cardiaca y daño por reperfusión<sup>[86-90]</sup>. Algunos estudios clínicos han encontrado niveles urinarios más elevados de LTE<sub>4</sub> en pacientes con isquemia miocárdica aguda<sup>[91]</sup> y niveles más elevados de LTB<sub>4</sub> en pacientes con enfermedad arterial coronaria comparado con controles sanos<sup>[92]</sup>. Nobili y colaboradores<sup>[93]</sup> sugieren que los efectos proinflamatorios y vasoconstrictores agudos y crónicos de la señalización de los CysLT podrían agravar la hipoxia miocárdica y la inflamación durante los ataques de hipoxia en la cardiopatía isquémica crónica. Asimismo, se ha evidenciado en cultivos de células endoteliales bajo condiciones de hipoxia, el incremento en la expresión de la FLAP, proteína indispensable para la síntesis de los LT y la actividad de la 5-LO, debido a la activación de la NADPH-oxidasa, la vía del fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), el NF-κB y el factor inducido por hipoxia HIF-1α lo que sugiere posibles mecanismos que llevan a la inducción de los LT en las enfermedades hipóxicas<sup>[94]</sup>.

Interesantemente, la hipoxia conduce a un incremento en las ROS y HIF-1 $\alpha$  los cuales se requieren para inducir al TGF- $\beta$ , el cual es inducido por la hipoxia<sup>[95]</sup>. Aunque se ha reportado que los especímenes de pacientes con ES no muestran un incremento del HIF-1 $\alpha$ <sup>[96]</sup>, la relación entre estos dos mediadores y la generación de ROS con los LT parece una nueva línea de investigación prometedora. La hipoxia se relaciona con la inducción de proteínas de la matriz extracelular pero la exposición de los FB de la dermis a hipoxia por menos de 6 horas no se ha asociado con la estabilización del HIF-1 $\alpha$  ni a la inducción de proteínas de la matriz extracelular. Esto se ha sugerido que pudiera explicar porque el FR primario no se relaciona con fibrosis, lo cual difiere del FR secundario asociado a ES donde la hipoxia crónica se asocia con una pérdida progresiva de los capilares del lecho ungueal y fibrosis progresiva<sup>[97]</sup>. Con base en el conocimiento previo, se postula con los resultados de esta investigación que podrían ocurrir mecanismos similares como resultado de la hipoxia crónica en el FR, lo cual eventualmente conduce a la pérdida de los capilares y a anomalías en la anatomía de los capilares del lecho ungueal, esto es consistente con la actividad biológica que se ha descrito previamente para los LT con base en sus funciones vasculares y al proceso de la fibrosis.

Estudios previos sugieren también una relación de los LT con la aterosclerosis<sup>[51,87-89,98,99]</sup>; los LT en la pared vascular ocasionan retención temprana de lípidos, acumulación de células espumosas e hiperplasia de la íntima vascular<sup>[99,100]</sup>. Más aún, el LTC<sub>4</sub> y el LTD<sub>4</sub> son potentes estimuladores del factor de von Willebrand<sup>[87,101]</sup>, y de otros factores vasoactivos y protrombóticos como el tromboxano<sup>[102]</sup>, el factor activador de las plaquetas<sup>[87]</sup>, la expresión de P-selectina<sup>[88]</sup> y pueden inducir la adherencia de los neutrófilos humanos<sup>[80,103]</sup>, lo cual podría ser relevante para la hemostasia, trombosis y daño vascular<sup>[80]</sup>. La activación de receptores en las células del músculo liso vascular se asocia directa e indirectamente con la vasoconstricción y la hiperplasia de la íntima<sup>[31,46,88,103,104]</sup>. Todos estos mecanismos podrían contribuir a la patogénesis del FR. Investigaciones previas han demostrado la síntesis de LT por las células del sistema vascular<sup>[51,105,106]</sup> y la expresión de receptores de LT en las células

endoteliales humanas<sup>[34,87,107]</sup>. Además, la conjugación del LTA4 con glutatión para formar el LTC4 puede tomar lugar en las células estructurales de la pared vascular y en las plaquetas<sup>[79,101]</sup> lo que puede conducir a la adhesión endotelial de los leucocitos a su superficie<sup>[31,34]</sup>. Las alteraciones vasculares observadas en la ES incluyen el FR, la hipertensión arterial pulmonar, la aterosclerosis, la enfermedad arterial coronaria, la hiperplasia de la íntima y respuestas protrombóticas, de tal manera que los LT podrían participar en asociación con otros mediadores en generar estas anormalidades.

El uso de la saliva para evaluar los niveles de LT tiene varias ventajas, la principal es que se trata de una técnica no invasiva que no genera ningún tipo de daño al paciente<sup>[108]</sup>. Las concentraciones elevadas de LTB4 en saliva humana contrastan con su casi nivel indetectable en la sangre, y el papel funcional en la saliva ha sido difícil de explicar. Sin embargo, observaciones previas apuntan a que los niveles de LTB4 en saliva pueden no tener solo actividad local en la cavidad oral sino también un impacto en la regulación de la función de los tejidos en sistema gastrointestinal<sup>[66]</sup>. Si los LT son secretados por las glándulas salivales, intercambiados en el epitelio ductal o sintetizados por las células de la cavidad oral aún es incierto<sup>[65]</sup>. Es necesario elucidar si las manifestaciones vasculares asociadas a niveles más elevados de LT son resultado de un proceso local o sistémico, sin embargo, las asociaciones encontradas en esta investigación entre los niveles plasmáticos y principalmente de la saliva con las manifestaciones vasculares periféricas encontradas en la capilaroscopia ungueal sugieren un proceso más bien sistémico.

Si los LT en la saliva y el plasma participan en el reclutamiento de las células o son resultado de la producción de las células reclutadas por otros mediadores o citoquinas continúa siendo una pregunta abierta, pero el conocimiento actual derivado de múltiples grupos de investigación sugiere que los LT podrían estar relacionados de alguna manera en la compleja red de mediadores que participan en la patogénesis de la ES<sup>[4,17,39,46-48,50,82]</sup>. Hasta donde sabemos, solo Liang y colaboradores<sup>[109]</sup> han investigado el efecto del bloqueo de la vía del LTB4. Estos investigadores evaluaron la trans-diferenciación de las células endoteliales-

mesenquimales y fibroblastos-miofibroblastos en cultivos celulares y encontraron que el tratamiento con suero de pacientes con ES aumentó la expresión de genes de colágena tipo I,  $\alpha$ -SMA y genes relacionados, mientras que el suero de controles sanos no se asoció con la expresión de dichos genes. Sin embargo, dichos cambios se revirtieron con el tratamiento de un antagonista selectivo del receptor BLT<sub>1</sub>. Basados en sus trabajos previos, estos investigadores identificaron que PI3K/Akt/mTOR (*mammalian target of rapamycin*, por sus siglas en inglés) estaban implicadas en la diferenciación de miofibroblastos en pacientes con ES y que Akt estaba implicada también en la señalización de BLT<sub>1</sub>. Por tanto, evaluaron el pretratamiento de FB humanos de la dermis y células endoteliales de vena umbilical (HUVEC) con el inhibidor de mTOR rapamicina o con un inhibidor de las vías PI3K/Akt y encontraron que el aumento de la expresión de  $\alpha$ -SMA y de colágena tipo I inducida por LTB<sub>4</sub> se revertía con el tratamiento. Los efectos exógenos del LTB<sub>4</sub> en la supresión de los genes marcadores de células endoteliales (E-cadherina y CD31) en las HUVEC y la inducción de los genes de diferenciación a miofibroblastos como  $\alpha$ -SMA, fibronectina, colágena 1A2 y 3A1 por LTB<sub>4</sub> también se revirtió. Además, para confirmar estos resultados utilizaron una estrategia de inhibición utilizando siRNA para bloquear las vías Akt y mTOR. El tratamiento con LTB<sub>4</sub> exógeno indujo la fosforilación de Akt y mTOR y esto mostró ser dependiente de la vía BLT<sub>1</sub> debido a que el pretratamiento con un inhibidor de BLT<sub>1</sub> bloqueó la fosforilación de Akt y mTOR. Para asegurar que los resultados no fueran derivados de la señalización por TGF- $\beta$ , se determinaron los niveles de TGF- $\beta$  y se encontraron que los niveles estaban por debajo del límite de detección del ensayo en medio de cultivo. Adicionalmente, el tratamiento con un inhibidor selectivo del receptor de TGF- $\beta$  I no tuvo efecto en la expresión de los genes mencionados previamente. Como resultado de estos experimentos, estos autores sugieren que la inhibición de la diferenciación de los miofibroblastos podría estar mediada por la interferencia con el eje LTB<sub>4</sub>/BLT<sub>1</sub> y la inactivación de PI3K/Akt/mTOR independientemente de la señalización de TGF- $\beta$ <sup>[109]</sup>. Adicionalmente, en el ratón con fibrosis inducida por bleomicina, un modelo animal de ES, el tratamiento con un antagonista de BLT<sub>1</sub> en la etapa temprana mostró

algunos efectos antifibróticos en la piel y los pulmones. Se observaron resultados similares en la etapa tardía pero el contenido de colágena en la piel no alcanzo diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo control<sup>[109]</sup>.

Con base en los hallazgos de este trabajo se tiene evidencia observacional sobre la posible relación de los LT con las manifestaciones vasculares de la ES y esto es acorde con las funciones descritas por múltiples trabajos previos de los LT. Por tanto, se postula que el bloqueo de los LT podría proveer una estrategia novedosa para el tratamiento de las manifestaciones vasculares de las pacientes con ES. Considerando que los LT ejercen efectos directos en el sistema vascular pero también en los estadios avanzados de la enfermedad. Las manifestaciones vasculares son causadas no solo por un desequilibrio en el tono vascular entre los mediadores vasodilatadores y vasoconstrictores, sino también por cambios estructurales en la microcirculación<sup>[1,23]</sup>, donde los LT podrían estar participando. En este sentido, investigaciones previas sugieren que el proceso de transición endotelial a mesenquimatoso a través del cual, las células endoteliales expresan productos como la colágena tipo I y la  $\alpha$ -SMA favorece un fenotipo profibrótico en la fisiopatología de la ES<sup>[24]</sup>. De hecho, el receptor de BLT<sub>1</sub> es abundante en células endoteliales y el LTB<sub>4</sub> promueve directamente la diferenciación a miofibroblastos a partir de células endoteliales vía BLT<sub>1</sub> y señalización por PI3/Akt/mTOR<sup>[109]</sup>. Sin embargo, esta enfermedad es muy probable que requiera un abordaje terapéutico que involucre el bloqueo de múltiples blancos y estimulación de otros. No es sorprendente esperar un tratamiento complejo en la ES, considerando que es una enfermedad sumamente compleja; sin embargo, los resultados de esta investigación y de otras sugieren que los LT podrían ser uno de esos blancos. El tratamiento de las manifestaciones vasculares se vuelve muy relevante no solo porque ocurre en prácticamente todos los pacientes con ES, sino también porque en muchos casos es muy difícil de tratar. Asimismo, el FR se asocia con una mayor morbilidad y con complicaciones graves como las UD, la gangrena, la disminución de la calidad de vida y la discapacidad. La historia de DU se ha mostrado como un factor predictor de la mortalidad<sup>[8]</sup>, pero también Pavan y colaboradores encontraron que puntajes avasculares bajos en la valoración inicial

por la NFC tienen mejores tasas de supervivencia, esto indica que las pacientes con mayor pérdida de capilares muestran peores desenlaces con respecto a la mortalidad<sup>[110]</sup>, posicionando a la NFC como una potencial herramienta pronóstica para la detección de casos de mayor riesgo. Estas observaciones estimulan el desarrollo de nuevas investigaciones que profundicen en la fisiopatología de las manifestaciones vasculares que conducen a la pérdida de capilares, como se ha mencionado previamente como resultado de esta investigación la pérdida de capilares se relacionó con niveles más elevados de LT. Otras limitaciones que influyen en la terapia del FR y de las manifestaciones vasculares son los eventos adversos asociados a los fármacos, como, por ejemplo, los vasodilatadores<sup>[23]</sup> y que algunos tratamientos son demasiado costosos y no están ampliamente disponibles para poblaciones de escasos recursos. Por lo tanto, la terapia anti-leucotrienos para las manifestaciones vasculares de la ES es un campo abierto para el estudio. Se requieren estudios para analizar su potencial terapéutico.

Por otro lado, el TGF- $\beta$  y la IL-10 son citoquinas que se han implicado en la fisiopatología de las ES y que tienen propiedades profibróticas<sup>[111]</sup>. En estudios previos se han determinado los niveles de TGF- $\beta$ 1 en pacientes con ES usando diferentes ensayos, pero los resultados han sido inconsistentes<sup>[111-114]</sup>, esta misma tendencia se ha observado en las concentraciones de IL-10 en pacientes con ES<sup>[111,114,115]</sup>. En esta investigación se determinaron los niveles de estos mediadores con el fin de explorar su relación con los LT. Las concentraciones de IL-10 se encontraron más elevadas en el grupo de pacientes y se asociaron con la presencia de anomalías vasculares principalmente la pérdida de capilares y el aumento del diámetro capilar, los niveles de TGF- $\beta$ 1 también estuvieron más elevados en el grupo con pérdida de capilares. Ya se ha mencionado previamente que hay evidencia que sugiere que el TGF- $\beta$  puede inducir la vía sintética de los LT<sup>[29,64]</sup>, pero también los LT inducen la síntesis de TGF- $\beta$  y los productos de la matriz extracelular por los FB<sup>[17,26,36,38,39]</sup>, otro mecanismo que sugiere la asociación entre estos mediadores (LT y TGF- $\beta$ ) como se ha mencionado, es a través de la hipoxia tisular<sup>[94,95]</sup> esto cobra relevancia en el contexto del FR en pacientes con ES ya que la interacción de estos mediadores pudiera estar

implicada. Las observaciones derivadas de esta investigación apoyan esta posible relación ya que tanto los niveles de LT como del TGF- $\beta$ 1 estuvieron significativamente más elevados en el grupo de pacientes con pérdida capilares que es resultado de la hipoxia tisular derivada del FR secundario. Los niveles salivales de LT y los de TGF- $\beta$ 1 e IL-10 en suero mostraron un patrón similar en cuanto a la pérdida capilar evaluada por la NFC, de hecho, las correlaciones mostraron una correlación positiva entre el CysLT plasmático y el TGF- $\beta$ 1 en suero y los LT salivales tuvieron una correlación positiva con los niveles plasmáticos de IL-10, sin embargo, no alcanzaron una significancia estadística con la corrección de Bonferroni, pero esto pudiera ser resultado del modesto tamaño de la muestra. Por lo que estas observaciones estimulan el desarrollo de nuevas investigaciones para investigar estos hallazgos. Es posible que estos mediadores participen en el desarrollo de las lesiones estructurales de la pared vascular que conducen a la vasculopatía crónica e irreversible en la ES.

De acuerdo con los resultados de la ICQ las células de cultivo mostraron marcadores de fibroblastos, pero en una proporción importante de miofibroblastos, los cuales se caracterizan por la expresión de  $\alpha$ -SMA<sup>[116]</sup>. Los FB pertenecen a una familia de células de fenotipo heterogéneo y entre ellas se encuentran los miofibroblastos que son células estromales que poseen propiedades funcionales intermedias entre los FB y las células de músculo liso y en donde la expresión de  $\alpha$ -SMA es el marcador más confiable para su identificación<sup>[117,118]</sup>. En condiciones normales estas células participan en el fenómeno de retracción y contracción de las heridas, por el contrario, los miofibroblastos persisten en las lesiones fibróticas en muchos órganos, en diferentes enfermedades, y están involucrados en el fenómeno de retracción y la acumulación de las proteínas de la matriz extracelular<sup>[116]</sup>. Usando marcadores del citoesqueleto, se han descrito diferentes tipos de miofibroblastos que se definen y denominan por las proteínas que co-expresan (desmina, vimentina y  $\alpha$ -SMA)<sup>[116]</sup>. La evaluación de las proteínas del citoesqueleto es útil para definir las características fenotípicas de los miofibroblastos en estudios experimentales y en la cicatrización de heridas<sup>[116]</sup>, pero no se conoce cuál es su papel en la fisiopatología de las enfermedades

fibróticas. En esta investigación no se esperaba encontrar en los cultivos celulares la alta frecuencia de miofibroblastos tanto para los FB provenientes del caso como del control, ya que la obtención de FB a partir de la biopsia de piel se realizó con base en un protocolo previamente publicado para la obtención de FB cutáneos utilizando la enzima tripsina que con los pasos teóricamente los separa de los queratinocitos dejando únicamente a la FB. Hay otros protocolos que utilizan la digestión enzimática como la dispasa II o la colagenasa para la separación de la epidermis de la dermis para la obtención posterior de los fibroblastos<sup>[4,119]</sup>; sin embargo, en los estudios antes mencionados en pacientes con ES no reportan la realización de marcadores de ICQ para la identificación de los FB previa a los experimentos<sup>[4,50,119]</sup>. Con base en esto sería ideal para el desarrollo de nuevos experimentos basados en células de cultivo, la purificación de las células.

Como ya se ha mencionado se considera que los miofibroblastos juegan un papel mayor en el desarrollo de la fibrosis de la piel en pacientes con ES debido a su capacidad de producir grandes cantidades de proteínas de la matriz celular, de hecho los análisis de las biopsias de piel en la ES han mostrado un aumento en los miofibroblastos y mayores depósitos de colágena que correlacionan con el puntaje cutáneo modificado de Rodnan; también se ha sugerido que las FB dérmicos cultivados provenientes de pacientes con ES muestran un fenotipo profibrótico a nivel transcripcional, debido a que producen cantidades incrementadas de proteínas de la matriz extracelular incluyendo colágena tipo I y fibrilarina y expresan niveles más elevados de proteínas implicadas en la vía del TGF- $\beta$ <sup>[120]</sup>. Chadli et al.<sup>[120]</sup> caracterizaron los fenotipos de la enfermedad en FB dérmicos aislados de biopsias de piel en ES temprana usando el perfil de transcripción y la expresión de  $\alpha$ -SMA, los análisis por microarreglos mostraron que las biopsias de pacientes tuvieron un perfil de transcripción diferente al de los controles mostrando una mayor expresión de los genes involucrados en la organización de la matriz extracelular y de las vías inmunológicas. Además, encontraron que una proporción de FB dérmicos se diferenció a miofibroblastos con incrementos en la expresión de CTGF y  $\alpha$ -SMA. Encontraron que la expresión de  $\alpha$ -SMA fue mayor en el grupo de pacientes comparado con los controles en el 2P, pero interesantemente



encontraron que esta diferencia se modificó conforme se aumentó el número de pase, encontrando que el cultivo *in vitro* llevó a un aumento general en la expresión de  $\alpha$ -SMA en los FB normales y sugieren que esto pudiera deberse al tiempo de cultivo en los frascos de plástico los cuales tienen una matriz de mayor rigidez. Estos hallazgos son compatibles con las observaciones encontradas en las células de los cultivos de FB para los experimentos, dado que las células utilizadas para los experimentos se realizaron entre los pases 6-8. En los análisis de microarreglos realizados por Chadli y colaboradores encontraron que los FB obtenidos de pacientes con ES presentaron la “firma” transcripcional de la ES hasta el 4P en alrededor del 77% de las células en cultivo *in vitro*, estos investigadores no realizaron análisis en pases posteriores por lo que se desconoce si esta firma transcripcional se preserva en pases subsecuentes. Aunque se ha sugerido que las células provenientes de cultivos de FB primarios podrían utilizarse hasta en 10 pases para evitar la senescencia y la producción anormal de colágena, los resultados del estudio de Chadli et al.<sup>[120]</sup> en conjunto con los hallazgos observados en esta tesis dan paso a la incertidumbre de que la ausencia de diferencia entre casos y controles pudiera radicar en que los pases de cultivo tengan implicaciones funcionales importantes y modifiquen el comportamiento de las células de cultivo tanto de pacientes como de controles. En esta investigación se comparó la expresión del mRNA por RT-QPCR y no se encontraron diferencias ni de manera basal ni tampoco tras la estimulación con calcimicina y LT. Teniendo como base estos hallazgos una hipótesis alternativa además del tamaño pequeño de la muestra, podría ser que la ausencia de las diferencias podría estar al menos en parte ocasionada por modificaciones funcionales importantes en las células de cultivo por el número de pase y un mayor tiempo de exposición de las células a las condiciones del microambiente de cultivo *in vitro*. Por lo que el diseño de nuevos experimentos debe contemplar las variaciones que pudieran encontrarse entre los pases y el tiempo de cultivo.

Kowal-Bielecka y colaboradores<sup>[4]</sup> demostraron la expresión de la 5-LO en FB de pacientes con ES y controles sanos usando RT-PCR y por FACS (*fluorescence-activated cell sorter analysis*, por sus siglas en inglés), sin embargo, no

encontraron diferencias entre controles y pacientes. Similar a estos hallazgos, en esta investigación se encontró la expresión de los receptores de CysLTR<sub>1</sub>, CysLTR<sub>2</sub> y BTL<sub>1</sub> en los FB cultivados de pacientes y controles, sin embargo, comparado con la expresión del mRNA de COL1A1, COL3A1, ACTB y GADPH, la expresión de los receptores de LT fue baja y no hubo diferencias entre el grupo de pacientes con ES y controles ni de manera basal, ni tampoco tras estimulación con ionóforo o con LTB<sub>4</sub> y CysLT. En los FB de controles tratados con suero proveniente de pacientes tampoco hubo diferencias en la expresión de los receptores de CysLTR<sub>1</sub>, CysLTR<sub>2</sub> y BTL<sub>1</sub> por RT-QPCR comparado con el tratamiento con suero autólogo. Sin embargo, la detección de LT en el sobrenadante de cultivo de los FB fue reportada como indetectable por lo que una posible explicación sería que la dosis de estimulación con LTB<sub>4</sub> y CysLT podría haber sido insuficiente en esos pozos. La razón por la cual los niveles de LT fueron indetectables en todos los pozos puede tener varias explicaciones. La principal pudiera ser que la cantidad producida por las células de cultivo sea menor al límite de sensibilidad del kit utilizado para su detección (*Leukotriene C4 EIA kit*, ítem No. 520211, límite de detección aproximado de 10 pg/mL), ya que Kowal-Bielecka et al.<sup>[4]</sup> reportaron niveles de LTB<sub>4</sub> por debajo del límite de detección del ensayo (ES: 7.7 pg/ml/10<sup>5</sup> a 12.6 pg/mL/10<sup>5</sup>, controles ES 5.5 a 7.0, límite de detección de LTB<sub>4</sub>: 13 pg/mL) y reportaron niveles de LTE<sub>4</sub> detectables pero menores (no reportan los niveles). A diferencia de este estudio, se midieron los niveles de LTC<sub>4</sub> en el sobrenadante, ya que es el que el protocolo del fabricante recomienda determinar en muestras de cultivo, pero en todos los pozos se encontró por debajo del rango de detección. Estos resultados contrastan con los reportados por Kowal-Bielecka y colaboradores<sup>[4]</sup> que utilizaron kits del mismo fabricante. Otra explicación podría ser que la duración de los estímulos celulares fuera demasiado prolongada y esto permitiera la degradación metabólica de los LT y que por esta razón al determinar el LTC<sub>4</sub> no se hubieran detectado los niveles de los productos finales como LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. Sin embargo, de acuerdo con el protocolo del fabricante las células cultivadas sintetizan el LTC<sub>4</sub> y éste se acumula en el medio sin metabolizarse, pero esto no pareció observarse en nuestros

cultivos a menos de que sea una cantidad menor al límite de sensibilidad del ensayo. Debido a la escasez de estudios con un abordaje similar en pacientes con ES aún no es claro si los FB o los miofibroblastos de pacientes con ES participan activamente en la producción de LT por inducción de citoquinas como TGF- $\beta$  o en respuesta a un mecanismo autocrino en respuesta a los propios LT. Con base en los resultados de estos experimentos no se encontraron diferencias en células cultivadas con relación a los LT, pero la expresión del mRNA de los receptores de LT en los FB cutáneos refuerza la idea de que los LT participan en la función de los FB y en las vías de fibrosis. Se requiere mejorar el diseño de estudios experimentales para determinar el papel de los LT en la ES tomando en cuenta variables como el tipo de células a estudiar (FB vs. miofibroblastos), dosis y duración de la estimulación celular, número de pase, tipo de LT a determinar (LTB4, LTD4, LTE4), tamaño de la muestra, variedad clínica (ESL vs. ESD) y duración de la enfermedad (temprana vs. tardía).

En este trabajo de investigación el tamaño de muestra modesto y el diseño transversal son limitaciones de este estudio, se requieren estudios longitudinales para valorar si los hallazgos se mantienen el tiempo y si se asocian con la progresión de la enfermedad. Otra limitación de este estudio es que algunos pacientes se encontraban en tratamiento con inmunosupresores, pero se incluyó en el modelo como covariable y no resultó estadísticamente significativa. Además, es importante mencionar que la mayoría de las pacientes evolucionan a pesar de los tratamientos actuales para la ES. Por lo tanto, se postula que incluso cuando algunos pacientes estaban bajo tratamiento inmunosupresor, lo cual puede afectar los niveles de los mediadores inflamatorios incluidos los LT, estos podrían no estar afectados o solo estar afectados parcialmente debido a que los inmunosupresores utilizados no son antagonistas específicos de los receptores de LT. Los resultados apoyan este postulado ya que el análisis del tratamiento inmunosupresor no disminuyó de manera significativa los niveles de LT comparado con pacientes sin tratamiento o controles. Por otro lado, es posible que los LT puedan tener interacciones complejas con otros mediadores de la enfermedad, así que esto podría explicar porque la enfermedad en la mayoría de los casos evoluciona a

pesar de los tratamientos inmunosupresores que se usan en la actualidad para el tratamiento de la ES.

El valor del presente estudio radica en dos principales ejes. Primero, provee datos observacionales para la generación de nuevas hipótesis de la fisiopatología de las manifestaciones vasculares en pacientes de esta enfermedad autoinmune, con posibles implicaciones en el tratamiento. Segundo, este estudio demuestra la importancia de la estratificación de las pacientes de acuerdo con su perfil clínico con el objetivo de identificar las diferencias entre las variables de estudio. En esta investigación, encontramos valores similares de LT entre las pacientes asintomáticas y los controles, lo mismo se observó para los parámetros de la NFC. Es decir, las pacientes que no tenían o tenía pocas anomalías tuvieron niveles similares a los controles, sin embargo, las pacientes sintomáticas o con anomalías importantes en la NFC mostraron los niveles más elevados de LT, apuntando a una posible relación con su patogénesis.

## **CONCLUSIONES**

Los niveles de cisteinil-leucotrienos y LTB<sub>4</sub>, principalmente en las muestras de saliva, se asociaron con el fenómeno de Raynaud y las anomalías capilaroscópicas en la esclerosis sistémica. La saliva probó ser una prueba útil para determinar los LT y estudiarlos en la ES. Los niveles de TGF- $\beta$  e IL-10 también se asociaron a la pérdida de capilares. Aunque las correlaciones entre los LT con las citoquinas proinflamatorias no alcanzaron la significancia estadística, las anomalías capilaroscópicas se asociaron a la elevación de los LT, pero también del TGF- $\beta$ 1 y la IL-10, lo que sugiere que podría haber una interacción entre estos mediadores.

Estos resultados apoyan la hipótesis del involucramiento de los LT como mediadores en la ES y promueven la investigación traslacional para determinar el papel de los LT y su relevancia en la compleja patogénesis de la enfermedad, con enfoque en el proceso del daño vascular y la fibrosis en la ES. Incluir a los LT en el contexto de la ES es muy importante, no solo desde el punto de vista de la patogénesis, sino también para considerar estrategias combinadas de tratamiento

para mejorar la calidad y la esperanza de vida en las pacientes con ES.

## PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados de este estudio es posible que los LT se encuentren relacionados de manera directa o indirecta en la patogenia de las manifestaciones vasculares de la ES, las cuales son un hallazgo temprano de la enfermedad. La actividad biológica de los LT corresponde, como se ha mencionado, con la tríada patogénica de la ES que consiste en alteraciones de la inmunidad (inflamación), vasculopatía y fibrosis. En este estudio se encontró una asociación entre los niveles de los LT y las manifestaciones vasculares principalmente el FR y la pérdida de capilares del lecho ungueal, interesantemente estos hallazgos se encontraron asociados también a niveles más elevados de citocinas profibróticas previamente descritas asociadas a la patogenia de la enfermedad lo que sugiere la posible interacción de los LT con otros mediadores profibróticos involucrados en la enfermedad. Existe evidencia que apoya la interacción de los LT con el TGF- $\beta$  de una manera sinérgica y bidireccional, así como una relación de los LT con el perfil de citocinas Th2 que es predominante en esta enfermedad. Estos hallazgos abren la posibilidad a una gran variedad de líneas de investigación con el fin de profundizar en el rol de los LT en las manifestaciones vasculares y aunado con la evidencia de estudios previos, también en las vías de fibrosis, ya que en gran medida la fibrosis también se ha asociado con la hipoxia generada por la vasculopatía. Es necesario profundizar en la interacción de los LT con el TGF- $\beta$  y la IL-10. Asimismo, hay una amplia gama de mediadores que se han descrito se encuentran involucrados en patogenia de la vasculopatía de la enfermedad por lo que una línea de investigación debería incluir la relación de los LT con estos mediadores como la endotelina-1, HIF- $\alpha$ , factor activador de plaquetas, entre otros. El abordaje debe incluir modelos animales y ensayos clínicos. Aunque desafortunadamente no se cuenta con un modelo animal único que represente todo el espectro de la enfermedad humana, existen diferentes modelos animales que cubren aspectos importantes de la enfermedad<sup>[121]</sup> para el caso de las manifestaciones vasculares el ratón transgénico Fra-2 (Fos-related antigen 2, por

sus siglas en inglés) es un modelo no solo de la fibrosis sino también para el estudio de la vasculopatía y la HAP que se asemeja a la desarrollada por los pacientes con ES. El ratón transgénico con deficiencia de cinasa del receptor tipo II del TGF- $\beta$  (T $\beta$ RII $\Delta$ k-fib) desarrolla fibrosis cutánea, pero desarrolla vasculopatía inducida por un inhibidor del factor de crecimiento derivado del endotelio por lo que es un modelo de HAP. Otros modelos de interés incluyen el ratón con deficiencia heterocigota de Klf5 (Kruppel-like factor 5, por sus siglas en inglés) y Fli1 (Friend leukemia integration 1, por sus siglas en inglés), el cual desarrolla de manera espontánea características de ES incluyendo fibrosis, vasculopatía, activación de linfocitos B y producción de autoanticuerpos; y el ratón con delección del gen uPAR (receptor activador plasminógeno tipo uroquinasa) que desarrolla fibrosis cutánea y pulmonar pero importante que presenta una vasculopatía de vasos pequeños similar a la de la ES<sup>[121]</sup>. Estos modelos animales podrían ser de utilidad para evaluar el papel de los LT en la vasculopatía en el contexto de la ES, sin embargo, la falta de un modelo animal apropiado del fenómeno de Raynaud<sup>[122]</sup> dificulta la investigación de la fisiopatología y el tratamiento dirigido a blancos específicos como los LT y otros mediadores que se sabe están implicados en esta manifestación. Por lo que es necesario el desarrollo de modelos animales que se asemejen al FR. Mientras tanto, con los hallazgos de estudio una opción es la realización de ensayos clínicos en pacientes con ES con FR, microangiopatía y alteraciones de la capilaroscopia ungueal para evaluar la posible interacción de los LT con otros mediadores como endotelina-1, factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , fibrinógeno, factor plaquetario-4, factor de von Willebrand que se han reportado elevados, así como con factores neurohormonales y la expresión de receptores adrenérgicos<sup>[122]</sup>. Una vía de especial interés a estudiar incluye la generación de especies reactivas de oxígeno que es un mecanismo que se ha mencionado relacionado a los LT pero que se ha implicado en la fisiopatología del FR<sup>[122]</sup>. Por otro lado, está aún por aclarar el hallazgo de este y otros estudios previos de cual es la razón de los niveles elevados de LT en saliva comparado con los niveles en plasma y otros líquidos corporales en condiciones fisiológicas, pero también en condiciones patológicas y cual podría ser la relación con la vasculopatía de la ES.

Por último, otros estudios han demostrado la implicación de los LT en las vías de fibrosis, especialmente en modelos animales de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, sin embargo, hay pocos estudios del papel de los LT en el modelo de esclerodermia inducido por bleomicina por lo que este modelo y otros modelos animales que representan la fibrosis similar a la ES son apropiados para abordar la posible relación de los LT en el desarrollo de la fibrosis y su interacción con otros mediadores principalmente el TGF- $\beta$  y la IL-10, con fines de profundizar en la patogenia y estudiar posibles terapias farmacológicas.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

1. Gabrielli, A., E.V. Avvedimento, and T. Krieg, Scleroderma. *N Engl J Med*, 2009. 360(19): p. 1989-2003.
2. Hughes, M. and A.L. Herrick, Systemic sclerosis. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2019. 80(9): p. 530-536.
3. Orlandi, M., et al., One year in review 2020: systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*, 2020. 38 Suppl 125(3): p. 3-17.
4. Kowal-Bielecka, O., et al., Evidence of 5-lipoxygenase overexpression in the skin of patients with systemic sclerosis: a newly identified pathway to skin inflammation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(8): p. 1865-75.
5. Chiffrot, H., et al., Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum*, 2008. 37(4): p. 223-35.
6. Perelas, A., et al., Systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Lancet Respir Med*, 2020. 8(3): p. 304-320.
7. Bairkdar, M., et al., Incidence and prevalence of systemic sclerosis globally: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*, 2021. 60(7): p. 3121-3133.
8. Poudel, D.R. and C.T. Derk, Mortality and survival in systemic sclerosis: a review of recent literature. *Curr Opin Rheumatol*, 2018. 30(6): p. 588-593.
9. Abu-Shakra, M. and P. Lee, Mortality in systemic sclerosis: a comparison with the general population. *J Rheumatol*, 1995. 22(11): p. 2100-2.
10. Bryan, C., et al., Survival following the onset of scleroderma: results from a retrospective inception cohort study of the UK patient population. *Br J Rheumatol*, 1996. 35(11): p. 1122-6.
11. Callahan, L.F. and T. Pincus, Mortality in the rheumatic diseases. *Arthritis Care Res*, 1995. 8(4): p. 229-41.
12. Chung, L., E. Krishnan, and E.F. Chakravarty, Hospitalizations and mortality in systemic sclerosis: results from the Nationwide Inpatient Sample. *Rheumatology (Oxford)*, 2007. 46(12): p. 1808-13.
13. Ioannidis, J.P., et al., Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data. *Am J Med*, 2005. 118(1): p. 2-10.

14. Lee, P., et al., Mortality in systemic sclerosis (scleroderma). *Q J Med*, 1992. 82(298): p. 139-48.
15. McLaughlin, V.V., Survival in patients with pulmonary arterial hypertension treated with first-line bosentan. *Eur J Clin Invest*, 2006. 36 Suppl 3: p. 10-5.
16. Mendoza, F. and C.T. Derk, Systemic sclerosis mortality in the United States: 1999-2002 implications for patient care. *J Clin Rheumatol*, 2007. 13(4): p. 187-92.
17. Chwieśko-Minarowska, S., et al., The role of leukotrienes in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Folia Histochem Cytobiol*, 2012. 50(2): p. 180-5.
18. Denton, C.P. and C.M. Black, Pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am*, 2003. 29(2): p. 335-49, vii.
19. Sallam, H., T.A. McNearney, and J.D. Chen, Systematic review: pathophysiology and management of gastrointestinal dysmotility in systemic sclerosis (scleroderma). *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. 23(6): p. 691-712.
20. Poudel, D.R., et al., Determinants of mortality in systemic sclerosis: a focused review. *Rheumatol Int*, 2018. 38(10): p. 1847-1858.
21. LeRoy, E.C., et al., Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*, 1988. 15(2): p. 202-5.
22. Silver, R.M. and A.U. Wells, Histopathology and bronchoalveolar lavage. *Rheumatology (Oxford)*, 2008. 47 Suppl 5: p. v62-4.
23. Hughes, M., et al., Raynaud phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*, 2020. 16(4): p. 208-221.
24. Cutolo, M., S. Soldano, and V. Smith, Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. *Expert Rev Clin Immunol*, 2019. 15(7): p. 753-764.
25. Cutolo, M., A. Sulli, and V. Smith, How to perform and interpret capillaroscopy. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2013. 27(2): p. 237-48.
26. Huang, S.K. and M. Peters-Golden, Eicosanoid lipid mediators in fibrotic lung diseases: ready for prime time? *Chest*, 2008. 133(6): p. 1442-1450.
27. Ogawa, Y. and W.J. Calhoun, The role of leukotrienes in airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 118(4): p. 789-98; quiz 799-800.
28. Boyce, J.A., Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev*, 2007. 217: p. 168-85.
29. Peters-Golden, M. and W.R. Henderson, Leukotrienes. *N Engl J Med*, 2007. 357(18): p. 1841-54.
30. Bäck, M., et al., Update on leukotriene, lipoxin and oxoeicosanoid receptors: IUPHAR Review 7. *Br J Pharmacol*, 2014. 171(15): p. 3551-74.
31. Calder, P.C., Eicosanoids. *Essays Biochem*, 2020. 64(3): p. 423-441.
32. Li, X., et al., Design and synthesis of Leukotriene A4 hydrolase inhibitors to alleviate idiopathic pulmonary fibrosis and acute lung injury. *Eur J Med Chem*, 2020. 203: p. 112614.
33. Castelino, F.V., Lipids and eicosanoids in fibrosis: emerging targets for therapy. *Curr Opin Rheumatol*, 2012. 24(6): p. 649-55.
34. Kim, N. and A.D. Luster, Regulation of immune cells by eicosanoid receptors. *ScientificWorldJournal*, 2007. 7: p. 1307-28.



35. Beller, T.C., et al., Cysteinyl leukotriene 1 receptor controls the severity of chronic pulmonary inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(9): p. 3047-52.
36. Lv, J., et al., BLT1 Mediates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis Independently of Neutrophils and CD4<sup>+</sup> T Cells. *J Immunol*, 2017. 198(4): p. 1673-1684.
37. Topaloğlu, N., et al., Protective effect of cysteinyl leukotriene receptor antagonist montelukast in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Turk Gogus Kalp Damar Cerrahi Derg*, 2018. 26(4): p. 588-597.
38. Hirata, H., et al., Leukotriene C4 aggravates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respirology*, 2013. 18(4): p. 674-81.
39. Kowal-Bielecka, O., et al., Elevated levels of leukotriene B4 and leukotriene E4 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma lung disease. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(6): p. 1639-46.
40. Woo, C.H., et al., Leukotriene B(4) stimulates Rac-ERK cascade to generate reactive oxygen species that mediates chemotaxis. *J Biol Chem*, 2002. 277(10): p. 8572-8.
41. Goldstein, R.E., Involvement of leucocytes and leukotrienes in ischaemic dysfunction of the coronary microcirculation. *Eur Heart J*, 1990. 11 Suppl B: p. 16-26.
42. Michelassi, F., H.K. Shahinian, and M.K. Ferguson, Effects of leukotrienes B4, C4, and D4 on rat mesenteric microcirculation. *J Surg Res*, 1987. 42(5): p. 475-82.
43. Garcia, J.G., et al., Leukotrienes and the pulmonary microcirculation. *Am Rev Respir Dis*, 1987. 136(1): p. 161-9.
44. Steiner, D.R., N.C. Gonzalez, and J.G. Wood, Leukotriene B(4) promotes reactive oxidant generation and leukocyte adherence during acute hypoxia. *J Appl Physiol (1985)*, 2001. 91(3): p. 1160-7.
45. Duah, E., et al., Cysteinyl leukotrienes regulate endothelial cell inflammatory and proliferative signals through CysLT<sub>2</sub> and CysLT<sub>1</sub> receptors. *Sci Rep*, 2013. 3: p. 3274.
46. Simms, R.W. and J.H. Korn, The role of leukotrienes in alveolitis associated with scleroderma. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(6): p. 1478-80.
47. Kowal-Bielecka, O., et al., Cyclooxygenase- and lipoxygenase-derived eicosanoids in bronchoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma lung disease: an imbalance between proinflammatory and antiinflammatory lipid mediators. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(12): p. 3783-91.
48. Tufvesson, E., et al., Increased cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate from systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford)*, 2010. 49(12): p. 2322-6.
49. Hackshaw, K.V., et al., Urine leukotriene E4 levels are elevated in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 1992. 19(2): p. 252-8.
50. Xiao, R., et al., Retinoic acids exhibit anti-fibrotic activity through the inhibition of 5-lipoxygenase expression in scleroderma fibroblasts. *J Dermatol*, 2011. 38(4): p. 345-53.

51. Wright, L., et al., 5-Lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) immunoreactivity in lungs from patients with primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 157(1): p. 219-29.
52. Izumo, T., M. Kondo, and A. Nagai, Effects of a leukotriene B4 receptor antagonist on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 2009. 34(6): p. 1444-51.
53. Peters-Golden, M., et al., Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. 165(2): p. 229-35.
54. Amlani, S., T. Nadarajah, and R.A. Mclvor, Montelukast for the treatment of asthma in the adult population. *Expert Opin Pharmacother*, 2011. 12(13): p. 2119-28.
55. Amlani, S. and R.A. Mclvor, Montelukast in childhood asthma: what is the evidence for its use? *Expert Rev Respir Med*, 2011. 5(1): p. 17-25.
56. Hallstrand, T.S. and W.R. Henderson, An update on the role of leukotrienes in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2010. 10(1): p. 60-6.
57. Montuschi, P. and M.L. Peters-Golden, Leukotriene modifiers for asthma treatment. *Clin Exp Allergy*, 2010. 40(12): p. 1732-41.
58. Riccioni, G., et al., Antileukotriene drugs: clinical application, effectiveness and safety. *Curr Med Chem*, 2007. 14(18): p. 1966-77.
59. Suzuki, N., et al., Difference in urinary LTE4 and 11-dehydro-TXB2 excretion in asthmatic patients. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2000. 62(4): p. 395-403.
60. Gaki, E., et al., Leukotriene E(4) in urine in patients with asthma and COPD-the effect of smoking habit. *Respir Med*, 2007. 101(4): p. 826-32.
61. Seggev, J.S., W.H. Thornton, and T.E. Edes, Serum leukotriene B4 levels in patients with obstructive pulmonary disease. *Chest*, 1991. 99(2): p. 289-91.
62. Wennergren, G., Inflammatory mediators in blood and urine. *Paediatr Respir Rev*, 2000. 1(3): p. 259-65.
63. Stelmach, I., et al., [Effect of montelukast on lung function and clinical symptoms in patients with cystic fibrosis]. *Pneumonol Alergol Pol*, 2004. 72(3-4): p. 85-9.
64. Steinhilber, D., O. Rådmark, and B. Samuelsson, Transforming growth factor beta upregulates 5-lipoxygenase activity during myeloid cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(13): p. 5984-8.
65. Ono, E., et al., Increase in salivary cysteinyl-leukotriene concentration in patients with aspirin-intolerant asthma. *Allergol Int*, 2011. 60(1): p. 37-43.
66. Bäck, M., et al., The oral cavity and age: a site of chronic inflammation? *PLoS One*, 2007. 2(12): p. e1351.
67. Gaber, F., et al., Saliva is one likely source of leukotriene B4 in exhaled breath condensate. *Eur Respir J*, 2006. 28(6): p. 1229-35.
68. van den Hoogen, F., et al., 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 2013. 65(11): p. 2737-47.
69. Clements, P., et al., Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol*, 1995.

- 22(7): p. 1281-5.
70. Cutolo, M., et al., Capillaroscopy. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2008. 22(6): p. 1093-108.
  71. Navazesh, M., Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci*, 1993. 694: p. 72-7.
  72. Rittié, L. and G.J. Fisher, Isolation and culture of skin fibroblasts. *Methods Mol Med*, 2005. 117: p. 83-98.
  73. Gil, P., *Cultivo de Células Animales y Humanas; Aplicaciones en Medicina Regenerativa*. Sonda ed. 2011, España: Visión Libros.
  74. Villegas, J. and M. McPhaul, Establishment and culture of human skin fibroblasts. *Curr Protoc Mol Biol*, 2005. Chapter 28: p. Unit 28.3.
  75. Flavahan, N.A., et al., The vasculopathy of Raynaud's phenomenon and scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am*, 2003. 29(2): p. 275-91, vi.
  76. Kahaleh, B., Vascular disease in scleroderma: mechanisms of vascular injury. *Rheum Dis Clin North Am*, 2008. 34(1): p. 57-71; vi.
  77. Lin, A.T., P.J. Clements, and D.E. Furst, Update on disease-modifying antirheumatic drugs in the treatment of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am*, 2003. 29(2): p. 409-26.
  78. Gaetano, J., *Holm-Bonfettoni Sequential Correction: An EXCEL Calculator (ver.1.2)*. 2013, Microsoft Excel: Redmond, WA, USA.
  79. Bäck, M., Leukotriene receptors: crucial components in vascular inflammation. *ScientificWorldJournal*, 2007. 7: p. 1422-39.
  80. Rovati, G.E. and V. Capra, Cysteinyl-leukotriene receptors and cellular signals. *ScientificWorldJournal*, 2007. 7: p. 1375-92.
  81. Lau, C.S., A. O'Dowd, and J.J. Belch, White blood cell activation in Raynaud's phenomenon of systemic sclerosis and vibration induced white finger syndrome. *Ann Rheum Dis*, 1992. 51(2): p. 249-52.
  82. Azevedo, M.N., et al., CysLT1 receptor inhibition in patients with Raynaud's phenomenon: capillaroscopic evidence of the role of leukotriene. *Rev Bras Reumatol*, 2012. 52(1): p. 30-2.
  83. Lefebvre, B., et al., Leukotriene B4: early mediator of atherosclerosis in obstructive sleep apnoea? *Eur Respir J*, 2008. 32(1): p. 113-20.
  84. Stanke-Labesque, F., et al., Leukotriene B4 pathway activation and atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J Lipid Res*, 2012. 53(9): p.1944-51.
  85. Kylhammar, D. and G. Rådegran, The principal pathways involved in the in vivo modulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction, pulmonary arterial remodelling and pulmonary hypertension. *Acta Physiol (Oxf)*, 2017. 219(4): p. 728-756.
  86. Li, R.C., et al., Leukotriene B4 receptor-1 mediates intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. 184(1): p. 124-31.
  87. Colazzo, F., et al., Role of the Cysteinyl Leukotrienes in the Pathogenesis and Progression of Cardiovascular Diseases. *Mediators Inflamm*, 2017. 2017: p. 2432958.
  88. Hoxha, M., G.E. Rovati, and A.B. Cavanillas, The leukotriene receptor

- antagonist montelukast and its possible role in the cardiovascular field. *Eur J Clin Pharmacol*, 2017. 73(7): p. 799-809.
89. Bäck, M., et al., Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol*, 2019. 16(7): p. 389-406.
  90. Wang, B., et al., Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*, 2021. 6(1): p. 94.
  91. Carry, M., et al., Increased urinary leukotriene excretion in patients with cardiac ischemia. In vivo evidence for 5-lipoxygenase activation. *Circulation*, 1992. 85(1): p. 230-6.
  92. J., N., et al., Association of Leukotriene gene Variants and Plasma LTB4 Levels with Coronary Artery Disease in Asian Indians. *ISRN Vascular Medicine*, 2013. 2013.
  93. Nobili, E., et al., Cysteinyl leukotriene signaling aggravates myocardial hypoxia in experimental atherosclerotic heart disease. *PLoS One*, 2012.7(7): p. e41786.
  94. Gonsalves, C.S. and V.K. Kalra, Hypoxia-mediated expression of 5-lipoxygenase-activating protein involves HIF-1alpha and NF-kappaB and microRNAs 135a and 199a-5p. *J Immunol*, 2010. 184(7): p. 3878-88.
  95. Zhou, G., et al., Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. 297(6): p. L1120-30.
  96. Beyer, C., et al., Hypoxia. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(2): p. 220.
  97. Distler, J.H., et al., Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 2007. 56(12): p. 4203-15.
  98. Riccioni, G., M. Bäck, and V. Capra, Leukotrienes and atherosclerosis. *Curr Drug Targets*, 2010. 11(7): p. 882-7.
  99. Chistiakov, D.A., et al., Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*, 2018. 104(2): p. 114-124.
  100. Riccioni, G., et al., Leukotrienes in atherosclerosis: new target insights and future therapy perspectives. *Mediators Inflamm*, 2009. 2009: p. 737282.
  101. Datta, Y.H., et al., Peptido-leukotrienes are potent agonists of von Willebrand factor secretion and P-selectin surface expression in human umbilical vein endothelial cells. *Circulation*, 1995. 92(11): p. 3304-11.
  102. Sakata, K., S.E. Dahlén, and M. Bäck, The contractile action of leukotriene B4 in the guinea-pig lung involves a vascular component. *Br J Pharmacol*, 2004. 141(3): p. 449-56.
  103. McIntyre, T.M., G.A. Zimmerman, and S.M. Prescott, Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83(7): p. 2204-8.
  104. Bäck, M., et al., Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(48): p. 17501-6.
  105. Zhang, Y.Y., et al., Expression of 5-lipoxygenase in pulmonary artery endothelial cells. *Biochem J*, 2002. 361(Pt 2): p. 267-76.

106. Voelkel, N.F., et al., Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) reduces pulmonary vascular reactivity and pulmonary hypertension in hypoxic rats. *J Clin Invest*, 1996. 97(11): p. 2491-8.
107. Rola-Pleszczynski, M. and J. Stankova, Cytokine-leukotriene receptor interactions. *ScientificWorldJournal*, 2007. 7: p. 1348-58.
108. Yoshizawa, J.M., et al., Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev*, 2013. 26(4): p. 781-91.
109. Liang, M., et al., Promotion of Myofibroblast Differentiation and Tissue Fibrosis by the Leukotriene B. *Arthritis Rheumatol*, 2020. 72(6): p. 1013-1025.
110. Pavan, T.R., et al., Capillary loss on nailfold capillary microscopy is associated with mortality in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*, 2018. 37(2): p. 475-481.
111. Baraut, J., et al., Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*, 2010. 10(2): p. 65-73.
112. Dziadzio, M., et al., Circulating levels of active transforming growth factor beta1 are reduced in diffuse cutaneous systemic sclerosis and correlate inversely with the modified Rodnan skin score. *Rheumatology (Oxford)*, 2005. 44(12): p. 1518-24.
113. Snowden, N., et al., Plasma TGF beta in systemic sclerosis: a cross-sectional study. *Ann Rheum Dis*, 1994. 53(11): p. 763-7.
114. Yang, C., et al., Altered CD4+ T cell and cytokine levels in peripheral blood and skin samples from systemic sclerosis patients and IL35 in CD4+ T cell growth. *Rheumatology (Oxford)*, 2021.
115. Hasegawa, M., et al., Serum chemokine and cytokine levels as indicators of disease activity in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*, 2011. 30(2): p. 231-7.
116. Schmitt-Gräff, A., A. Desmoulière, and G. Gabbiani, Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch*, 1994. 425(1): p. 3-24.
117. Gabbiani, G., The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*, 2003. 200(4): p. 500-3.
118. Sappino, A.P., et al., Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells. *Am J Pathol*, 1990. 137(3): p. 585-91.
119. Corallo, C., et al., Proteomic Investigation of Dermal Fibroblasts Isolated from Affected and Unaffected Skin Samples from Patients with Limited Cutaneous Systemic Sclerosis: 2 Distinct Entities? *J Rheumatol*, 2017. 44(1): p. 40-48.
120. Chadli, L., et al., Identification of regulators of the myofibroblast phenotype of primary dermal fibroblasts from early diffuse systemic sclerosis patients. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 4521.
121. Marangoni, R.G., Varga J., Tourtellotte W.G. Animal models of scleroderma: recent progress. *Curr Opin Rheumatol*, 2016. 28(6): p. 561-70.
122. Fardoun M.M., Nassif J., Issa K., Baydoun E., Eid A.H. Raynaud's Phenomenon: A Brief Review of the Underlying Mechanisms. *Front*

Pharmacol, 2016. 7: p. 438.