



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLOÓGICAS Y DE LA SALUD.
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS. ISMAEL
COSIO VILLEGAS.

“PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR NLRP3 INFLAMASOMA EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LOS PACIENTES CON SÍNDROME ANTISINTETASA”

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS
PRESENTA:

ÁNGEL EMMANUEL VEGA SÁNCHEZ

Director de Tesis: Dr. en C. JORGE ROJAS SERRANO
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ciudad Universitaria, Ciudad de México, julio 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

COMITÉ TUTORIAL

DR. JORGE ROJAS SERRANO
UNIDAD DE ENFERMEDADES DEL INTERSTICIO PULMONAR Y REUMATOLOGÍA,
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
“ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

DR. ESPIRIDIÓN RAMOS MARTÍNEZ
UNIDAD DE MEDICINA EXPERIMENTAL, FACULTAD DE MEDICINA.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

DRA. IVETTE BUENDÍA ROLDÁN.
LABORATORIO DE MEDICINA TRASLACIONAL, ENVEJECIMIENTO Y FIBROSIS PULMONAR
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
“ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

DR. ROGELIO PÉREZ PADILLA
COORDINADOR ACADÉMICO
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
“ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

Tabla de contenido

Resumen.....	4
1. INTRODUCTION	6
2. Pacientes y métodos.....	8
2.1 Pacientes, criterios de inclusión y exclusión.....	8
2.2. Pruebas de funcionamiento pulmonar.	10
2.3 Recolección de lavado bronquiolo alveolar.....	11
2.4 Tomografía de alta resolución.	12
2.5 Auto Anticuerpos.	13
2.6 Ensayo de citocinas.	13
2.8 Caspasa 1.....	14
2.9 Ensayo de inmuno absorción ligado a enzima. (ELISA) para NLRP3.....	14
2.10 Análisis estadísticos.....	15
3. RESULTADOS.....	15
3.1 Pacientes.	15
3.2 Perfil de citocinas inflamatorias y proteínas de la vía del inflamasoma.	16
3.3 Concentraciones de LDH y la actividad de Caspasa 1 en el lavado bronquiolo alveolar.....	16
3.4 Tomografía de tórax por escala de Gho en los pacientes de ambos grupos....	17
3.5 Perfil de citocinas inflamatorias y proteínas de las vías del inflamasoma por el perfil de anticuerpos de los pacientes con síndrome antisintetasa.	18
3.5 Análisis de asociación entre proteínas y citocinas del inflamasoma.....	18
4. DISCUSION.....	19
5.- Material suplementario	25
Tablas	25
Images.....	30
5. Referencias.	33

Resumen.

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR NLRP3 INFLAMASOMA EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LOS PACIENTES CON SÍNDROME ANTISINTETASA

Introducción: El síndrome antisintetasa (SAS) es un padecimiento sistémico de naturaleza autoinmune, que se caracteriza por una alta incidencia de enfermedad pulmonar intersticial (EPID) y la presencia de auto anticuerpos anti aminoacyl-tRNA sintetasas (anti-tRNA). La EPID en la mayoría de los casos es predominantemente inflamatoria y alrededor de un 10% de los casos tiene patrones pulmonares fibrosantes progresivos (PPFP). Un trabajo reciente describió que los pacientes con SAS y PPFP tienen un fenotipo inflamatorio de citocinas séricas TH17 elevado (IL-17A, IL-1 β , IL-18 e IL-6). Este perfil puede predecir la progresión de la enfermedad pulmonar. La elevación de la IL-1 β , y de IL-18 sugieren que sensores del sistema inmune innato participan en la fisiopatología del SAS, ya que estas dos citocinas son un producto proteolítico de la caspasa -1 secundario a la activación del inflammasoma.

Objetivo: Evaluar si existe activación del inflammasoma de NLRP3 en los pulmones de pacientes con SAS, utilizando muestras de lavado bronquiolo alveolar (LBA).

Pacientes y Métodos: Se reclutaron pacientes con diagnóstico de SAS sin previo tratamiento inmunosupresor, evaluados en la Unidad de Enfermedades de Intersticio Pulmonar y Reumatología (UEIP&R) que contaran con LBA, tomografía de tórax de alta resolución (TCAR) y pruebas de función respiratoria como parte de su evaluación diagnóstica. Se reclutaron pacientes con esclerosis sistémica con

EPID (SSc) como controles. El LBA fue concentrado y se midieron 11 citocinas y el lactato deshidrogenasa (LDH). Con el botón celular obtenido se midieron las concentraciones de NLRP3 y Caspasa 1.

Resultados: Las concentraciones de Caspasa 1 y LDH fueron mayores en el grupo SAS a las observadas en SSc, (1.25 vs 0.75 $p < 0.001$; 0.15 vs 0.09 $p < 0.01$ respectivamente). La IL-1 β y la IL-18 tuvieron una tendencia a estar elevadas en el grupo de pacientes con SAS (1.44 vs 0.58, $p = 0.05$; 1.42 vs. 0.87, $p = 0.07$) En los pacientes con SAS se observó una correlación entre la Caspasa1 y la LDH (Rho 0.58, $p = 0.008$), entre la IL-18 y la LDH (Rho 0.55, $p = 0.01$) y la LDH y NLRP3 (Rho -0.42, $p = 0.07$). En los pacientes con SSc, no se observó ninguna correlación.

Conclusión: En los pacientes con SAS se observa mayor actividad de Caspasa 1 y de LDH, lo que sugiere un proceso de activación del inflamasoma dando como consecuencia un proceso inflamatorio crónico, muerte celular por piroptosis y el desarrollo de un proceso de autoinmune relacionado a SAS.

1. INTRODUCTION

El síndrome antisintetasa (SAS), se caracteriza por la presencia de enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID), miositis, artritis, signo de manos de mecánico, fiebre y fenómeno de Raynaud ¹ junto con la presencia de autoanticuerpos anti-aminoacil transferencia-ARN-sintetasas (anti-ARNt) , que incluyen anti-Jo1 (anti-histidilo), anti-PL12 (anti-alanilo), anti-PL7 (anti-treonilo), anti-EJ (anti-glicilo), anti-OJ (anti-isoleucilo), anti- SC (anti-lysil), anti - KS (anti-asparaginy), anti - JS (anti-glutaminy), anti - Ha (anti-tyrosyl) o anti - YRS (anti-threonyl), anti-triptophanyl y anti-Zo (anti-fenilalanilo), siendo el anti-Jo1 el más frecuente, presente en el 68% en pacientes con SAS ². La EPID es la principal causa de mortalidad y morbilidad en este síndrome y los patrones tomográficos más frecuentemente observados son inflamatorios, como la Neumonía organizada (NO) y la Neumonía Intersticial no específica (NINE). Los pacientes con estos patrones en su mayoría responden favorablemente al tratamiento con corticosteroides e inmunosupresores. Sin embargo, alrededor del 13% de los pacientes con SAS, tienen patrones fibrosantes como el patrón de neumonía intersticial usual (NIU), estos pacientes tienen progresión de la enfermedad pulmonar y no responden al tratamiento con corticosteroides e inmunosupresores ^{3, 4}.

Uno de los mecanismos propuestos en la fisiopatología de algunas enfermedades autoinmunes, que se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos como es el caso de la artritis reumatoide positiva a anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados, es que a nivel pulmonar existe una interacción ambiental inmunológica, que desencadena el fenómeno autoinmune. La exposición continua a diversos

agentes infecciosos, contaminantes o alérgenos, pueden provocar un fenómeno inflamatorio que dé lugar a mecanismos de reparación celular a nivel de la membrana alveolo capilar, resultando en una activación constante del sistema inmune innato y sus receptores ⁵. Esta activación permanente del sistema inmune innato, en el contexto genético de riesgo, puede desencadenar procesos fisiopatológicos que den lugar a enfermedades autoinmunes ⁶. Se ha descrito que fenómenos inflamatorios crónicos pueden dar lugar a la formación de neoantígenos, que también pueden contribuir al desarrollo de la autoinmunidad. Se ha descrito que algunos antígenos pueden ser modificados y diseminados por la actividad de la granzima B en el tejido pulmonar ⁷. Estos antígenos modificados tienen la capacidad de ser quimioatrayentes para linfocitos y monocitos activados ⁸.

En un trabajo previo, se describió que en los pacientes con SAS el perfil inflamatorio predominante es TH17. observando que las citocinas IL-1 β , IL-17 y la IL-6, tienen capacidad de ser predictoras de progresión de la EPID ⁹; dentro de este perfil, la IL-1 β , y la IL-18 son producto de la actividad proteolítica de la caspasa 1 posterior a la activación del inflamasoma ¹⁰, que es una plataforma multiproteica presente en el citoplasma, que se forma en respuesta a la presencia de diferentes señales de estrés o microbianas. La activación del inflamasoma también dispara la escisión de la gasdermina D por la caspasa-1 y la caspasa-11. El fragmento N terminal de la gasdermina D forma oligómeros a nivel de la membrana plasmática que forman poros, que ocasionan una rápida pérdida de la integridad de la membrana, con la liberación de contenido citosólico al medio extracelular¹¹ dando lugar a la muerte celular por piroptosis. La activación del inflamasoma es una espada de doble filo:

por una parte, es vital para el control de infecciones, pero por otra la sobreactividad del inflammasoma puede dar lugar a procesos inflamatorios crónicos y se ha relacionado a múltiples condiciones mediadas inmunológicamente, como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson entre otras.

El objetivo de este estudio fue evaluar si el inflammasoma participa en la fisiopatología de la EPID asociada a SAS; para cumplir con nuestro objetivo, evaluamos en el Lavado bronquiolo alveolar (LBA) de pacientes con SAS, la presencia de sus componentes, receptores y productos finales en la vía como son NLRP3, Caspasa 1, LDH e IL- 1 beta y la IL 18, y la asociación entre ellas ^{12, 13} y se comparó con un grupo control formado por pacientes con EPID secundaria a SSc.

2. Pacientes y métodos.

2.1 Pacientes, criterios de inclusión y exclusión.

Se reclutaron a paciente mayores de 16 años, con diagnóstico de SAS, que fueron evaluados en la unidad de enfermedades del intersticio pulmonar y reumatología (UEPID&R) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), en el periodo de marzo de 2019 a febrero de 2020. Los pacientes con SAS se reclutaron bajo los siguientes criterios: presencia de EPID demostrada con Tomografía de alta Resolución (TCAR) junto con la presencia de alguno de los anticuerpos anti-tRNA, los pacientes podían tener o no la presencia de signos clínicos como artritis, fenómeno de Raynaud, miositis, manos de mecánico o fiebre ¹⁴. Se reclutó un grupo control de pacientes con EPID secundaria a SSc de acuerdo con los criterios de clasificación del ACR/EULAR 2013¹⁵. Para fines de este estudio, los pacientes

incluidos deberían contar con un LBA realizado en su evaluación inicial en la UEIP&R, previo al inicio de cualquier tratamiento inmunosupresor o con corticosteroides.

El protocolo de diagnóstico de la UEIP&R incluye una historia clínica y exploración física completa, en la que se registran datos demográficos, antecedentes de exposiciones respiratorias, la presencia de síntomas respiratorios y sistémicos e inicio aproximado de los síntomas, duración y frecuencia. Se realiza TCAR al ingreso y una evaluación serológica en búsqueda de anticuerpos asociados y específicos a miopatías inflamatorias (MI) y SSc utilizando inmunoblots de EUROIMMUNE para miositis y esclerosis, así como anticuerpos antinucleares (ANAs) por inmunofluorescencia. Se realizan pruebas de función pulmonar que incluyen espirometría con broncodilatador, prueba de difusión de monóxido de carbono en respiración única (DLCOsb) y caminata de 6 minutos (C6M). Las especificaciones de estas pruebas se explican en detalle en la sección correspondiente, así como sus referencias técnicas. Los pacientes evaluados en la UEIP&R se valoran con base en sus características funcionales pulmonares para decidir que pacientes son candidatos a LBA de forma segura y como parte de su protocolo diagnóstico. Para este proyecto de investigación solo se reclutaron aquellos pacientes en quien se hubiera practicado el LBA y se tuviera disponible para estudio.

Para este estudio se excluyó a los pacientes que hubieran recibido tratamiento con inmunosupresores previamente. Debido a que existe sobreposición de SSc con otros padecimientos autoinmunes, se excluyó a los sujetos con sobreposición

serológica entre SSc y síndrome anti sintetasa o con anticuerpos asociados a miositis. Los sujetos con SSc con patrones inflamatorios o con LBA de predominio linfocítico también fueron excluidos. El protocolo fue autorizado por el comité de ética institucional (número de protocolo B31-20). Los pacientes incluidos brindaron su consentimiento informado por escrito para participar en este estudio.

2.2. Pruebas de funcionamiento pulmonar.

Las pruebas de función pulmonar se realizaron en el laboratorio de investigación traslacional en envejecimiento y fibrosis pulmonar del INER. Los criterios para realizar las pruebas de función pulmonar son los siguientes: Ayuno de al menos 4 horas, no utilizar broncodilatadores o haber suspendido el uso de broncodilatadores por al menos 12 horas. No requerir oxígeno suplementario o en caso de requerirlo, que sea posible suspender el uso de oxígeno durante la realización de las pruebas. Espirometría con broncodilatador la cual se realizó por medio de un equipo EASYONE Pro Lab de la marca NDD. Esta prueba se realizó bajo los criterios de las guías ATS/ERS.¹⁶ los valores predichos para cada sujeto se obtuvieron de tablas de referencias ajustada a edad, genero, talla y raza.¹⁷ Los resultados se expresan en litros y su porcentaje del predicho. Se reporta la Capacidad Vital Forzada (CVF), el Volumen espirado forzado en el primer segundo (VEF1) y el cociente CVF/VEF1. Difusión pulmonar de monóxido de carbono (DLCO_{sb}) se realizó por medio del equipo EASYONE Pro Lab de la marca NDD, por medio de dilución de helio, según los lineamientos de referencia para la prueba. Los resultados de esta prueba se expresan por valores de referencia ajustados para cada sujeto por edad, sexo, talla y raza, así como a la altitud donde se realiza la prueba¹⁸ Los valores de esta prueba se reportan como porcentajes del predicho de

unidades DLCO ajustadas a la altitud. La realización de esta prueba requiere ausencia de uso de oxígeno suplementario, por lo que algunos sujetos con requerimiento continuo de oxígeno no pudieron realizarla. La prueba de caminata de 6 minutos (C6M) se realiza en pasillo de 30 metros, obteniendo la distancia que el paciente puede recorrer en función del tiempo, expresando el mejor valor obtenido en metros de la prueba. En caso de requerir apoyo de oxígeno suplementario se puede aportar durante la prueba ¹⁷. Todas las pruebas fueron interpretadas por neumólogos de la UEPID&R ⁴. En el caso de este trabajo de investigación, algunos pacientes en su evaluación basal tenían exacerbación aguda pulmonar o franca insuficiencia respiratoria, por lo que no se les realizó alguna o todas las pruebas de funcionamiento pulmonar.

2.3 Recolección de lavado bronquiolo alveolar

El LBA se realizó como parte del protocolo diagnóstico de todos los pacientes ingresados a las UEPID&R, dentro del servicio de broncoscopía diagnóstica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), este procedimiento se realiza bajo consentimiento firmado por parte del familiar o su representante legal, para la realización de sedación, y broncoscopía. Se utiliza un equipo Olympus 1T180, video broncoscopio flexible; En todos los casos se realiza lavado bronquiolo alveolar de lóbulo medio y la língula. Se instilan 300 ml de solución fisiológica estéril recuperando hasta el 60 % (130 a 160 ml) y se realiza aspiración por medio de jeringas de 60 ml. El material obtenido se coloca en frascos estériles y se transporta a los servicios clínicos de patología, microbiología y laboratorios de investigación. La muestra en investigación se centrifuga a 300 g, por 15 minutos a 4°C y el

sobrenadante se conserva en congelación a -80°C . El botón celular se suspendió en 5 ml de solución de Hank, este también se congela a -80°C para después realizar purificación de proteínas.

2.4 Tomografía de alta resolución.

La TACAR se realiza como evaluación inicial de los pacientes, cada secuencia se conforma de una fase en inspiración y espiración de hasta 25 imágenes. Estas imágenes se interpretaron por los investigadores de manera independiente y sin conocer sus datos clínicos para evitar sesgos. Las imágenes se clasifican según el consenso ATS/ERS para neumonías intersticiales en los siguientes patrones; NINE inflamatoria (NINE-I) o en patrón NINE fibrótico (NINE-F), Neumonía intersticial usual (NIU), Neumonía organizada (NO) y patrón mixto NINE-I + NO. Las discrepancias en la interpretación se resuelven por consenso. La Extensión se determina por la extensión que se afecta en tomografía del patrón fibrótico e inflamatorio, por medio de la escala de Goh la cual es una escala que evalúa 5 cortes de la tomografía y expresa en porcentaje de fibrosis o inflamación de manera visual, con esto se obtiene un porcentaje total. El patrón fibrótico se definió por la presencia de opacidades reticulares, retracción bronquial o quistes en el pulmón. Mientras que el patrón inflamatorio se definió como la presencia de vidrio despolido o consolidación en el parénquima pulmonar. Los hallazgos descritos no son mutuamente excluyentes y se clasifica la extensión de ambos en la tomografía para definir el patrón¹⁹.

2.5 Auto Anticuerpos.

Los anticuerpos IgG anti-tRNA (anti-JO1, anti-PL7, anti-PL12, anti-Ej, anti-OJ) fueron medidos usando el panel de inmunoblot EUROLINE: Myositis Profile 4, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La especificidad para anti-Jo1, anti-PL7, anti-PL12 se ha reportado del 100% ²⁰. Los anticuerpos asociados a SSc se midieron utilizando un panel de inmunoblot de “EUROLINE nucleolar pattern”, que mide los anticuerpos anti-centrómero, anti topoisomerasa, anti RNA polimerasa, anti Th/To, anti fibrilarina, anti PM/SCL, anti Ku, anti Nor90, anti PDGFR, todos altamente específicos para esclerosis sistémica.

2.6 Ensayo de citocinas.

Para realizar la cuantificación de los niveles de citocinas en el LBA, concentramos a 50 veces el volumen de la muestra, las concentraciones en todos los casos fueron igualadas a 200µg por ml. Se utilizó un panel comercial para la determinación de citocinas tipo ProcartaPlex Human Th1/Th2 panel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, cat. EPX180-12165-901). Se midieron las interleucinas: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-13, IL-18, Interferon (IFN)-γ, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral (TNF)-α. La evaluación del Multiplex fue realizada según las especificaciones del fabricante. Las muestras fueron homogeneizadas y ajustadas para la cuantificación del sistema Luminex®LABScan 100 (Luminex Corp. Austin, TX, USA). Las concentraciones de citocinas fueron calculadas usando curvas estándar generadas por 5 valores obtenidos por el método de regresión logística. En las muestras donde

las citocinas no fueran detectadas se utilizaron los valores del límite inferior de detección de la prueba. Se utilizó el software xPONENT 3.1 (Luminex Corp. Austin, TX, USA) para la obtención y análisis de los datos.

2.8 Caspasa 1.

La determinación de la actividad de la Caspasa 1, fue realizada en el botón celular obtenido del LBA. Se utilizaron 50 µg de proteína purificada del botón celular. La determinación de la actividad de la proteína se realizó, por medio de un Kit comercial Caspase 1 Assay kit (ab39412, Abcam). La utilización de este fue con base en las indicaciones del fabricante. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado en 3 experimentos independientes.

2.9 Ensayo de inmuno absorción ligado a enzima. (ELISA) para NLRP3.

La técnica ELISA fue utilizada para determinar el nivel de LDH. Esto por medio de un Kit comercial (Abcam™ ab102526) se utilizó la muestra de LBA concentrada. Además, se utilizó el Kit comercial NLRP3 (Abcam™ ab274401) utilizando 50 ng de proteína de acuerdo con las indicaciones del fabricante para cada Kit. (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Los pozos duplicados se establecieron como muestras se referencia estándar. Los valores finales de absorbancia de la proteína fueron leídos en un microplate lector a 450 nm. Los valores medios fueron usados para calcular curvas estándar para los valores correspondientes a LDH y NLRP3.

2.10 Análisis estadísticos.

Se describen las variables continuas con base en su distribución, en medias con desviación estándar o medianas con rango Inter cuartil, las variables categóricas, se presentan en frecuencias y porcentajes. Se compararon las variables por grupos con prueba T Student, Prueba U de Mann-Whitney según sea el caso y la prueba exacta de Fisher para variables dicotómicas. Las comparaciones entre citocinas inflamatorias y proteínas del inflamasoma, se analizaron con pruebas no paramétricas, por medio de U de Mann-Whitney por el tamaño de la muestra. Se analizó la fuerza de asociación entre las citocinas y proteínas del inflamosoma en el LBA por medio de Rho de spearman.

3. RESULTADOS.

3.1 Pacientes.

Se reclutaron 19 pacientes con SAS y 17 sujetos con SSc. La mayoría de los pacientes fueron del género femenino, y se observó una mayor positividad a los auto anticuerpos anti-PL7 y anti-TH/To en cada grupo. De los sujetos con SAS, el anticuerpo más frecuente fue el Anti-PL-7 (8/42%), seguido del anti-Jo-1 (4/22%). En el caso de la SSc, el auto anticuerpo más común fue Th/To (12/17 (70.5%)), seguido de anti NOR-90 (5/17 (29.5%)). La tabla 1, describe las características clínicas de ambos grupos y se compara al grupo de SAS contra el de SSc; no existieron diferencias en cuanto a sexo, edad y comorbilidades. Sin embargo, si existieron diferencias esperadas en la frecuencia de fiebre y el signo de manos de mecánico, en los patrones tomográficos y en las características del LBA, siendo

macrofágico en los sujetos con SSc y linfocítico en los SAS. Estos contrastes estadísticos son esperadas, dado las características propias de cada enfermedad.

3.2 Perfil de citocinas inflamatorias y proteínas de la vía del inflamasoma.

Dentro de las citocinas y proteínas asociadas a la vía del inflamasoma, encontramos que los pacientes con SAS tenían una mayor actividad de la Caspasa 1, y una mayor concentración de IL -18 e $INF\gamma$ en LBA; además de mayor concentración de LDH en el botón celular, en comparación con el grupo de SSc. Por otra parte, la caspasa 1, la IL-18, la LDH y el NLRP3 presentaron una correlación en los pacientes con SAS. La cuantificación de las citocinas mostró una diferencia estadísticamente significativa en IL – 18 y $IFN\gamma$, y una tendencia en IL-1 β a ser diferente, entre grupos, la IL- 1 β , tuvo valores de SAS 1.44 pg/ml (IC 0.5 – 4.10 pg/ml) vs 0.58 pg/ml (IC 0.45 – 1.11 OD) $p= 0.07$. Por otra parte, la IL-18 en SAS tuvo valores de 1.42 (IC 0.98 – 2.65) vs 0.87 (IC 0.62 – 1.14) en SSc, $p= 0.002$. y el $IFN\gamma$, en SAS presentó niveles de 0.95 (0.9 – 1.09) y en SSc 0.86 (0.81 – 0.95) pg/m, $p=0.01$. El resto de las citocinas que se exploraron por el panel de Luminex, se describen en la tabla 2. en los resultados.

3.3 Concentraciones de LDH y la actividad de Caspasa 1 en el lavado bronquiolo alveolar.

Para evaluar la actividad del fenómeno inflamatorio asociado a la actividad del inflamasoma, se determinó la actividad de las proteínas que participan en esta vía como son NLRP3, Caspasa 1 y el producto final de la piroptosis celular (LDH). Se encontró que la Caspasa 1 en SAS fue mayor que en los pacientes con SSc. (1.25 URF (IC 1.15 – 1.35 URF) vs 0.75 URF (CI 0.62 – 1.14 URF) $p= >0.0001$) así como

el valor de LDH en LBA también fue superior en SAS. LDH 0.15 ODU (CI 0.14 – 0.19 OD) vs 0.09 ODU (CI 0.09 – 1.0 OD) $p = >0.0001$. Situación que no se observó en las concentraciones de NLRP3 donde no hubo diferencia entre grupos (10.34 ng/ml (CI 9.76 – 10.93) vs 10.69 (CI 10.34 – 13.02), $p = 0.15$.)

3.4 Tomografía de tórax por escala de Gho en los pacientes de ambos grupos.

En el grupo SAS la extensión total de enfermedad intersticial tuvo una mediana de 74% (RIC 48%-82%) lo cual no fue diferente en el grupo control 60% (RIC 54%-68%) $p = 0.32$. Sin embargo, por las características de cada grupo en particular se observa diferencias significativas, pero esperada entre la cuantificación de inflamación y fibrosis de la escala de Gho. En la cuantificación de inflamación el grupo SAS 76% (RIC 54%-82%) vs 28% (RIC 22%-34%), $p = 0.01$ y en la cuantificación de fibrosis el grupo SSc presentó 72% (RIC 66%-78%) vs 24% (RIC 18% - 46%), $p = 0.01$, se describe en la tabla 1 los valores de la escala de Gho. Sin embargo, al buscar la presencia de correlación entre la cuantificación de inflamación por Gho y las citocinas, encontramos que el receptor NLRP3 tiene una asociación significativa con la extensión del daño en la tomografía, solo en los pacientes SAS ($Rho = 0.53$, $p = 0.02$) pero no se observó asociación al analizar por inflamación o fibrosis. El resto de las correlaciones no fueron significativas y se presentan en la tabla 5.

3.5 Perfil de citocinas inflamatorias y proteínas de las vías del inflamasoma por el perfil de anticuerpos de los pacientes con síndrome antisintetasa.

Se ha descrito en la literatura que los pacientes con anti-PL 7 y anti-PL-12, tiene un peor pronóstico comparado con los sujetos positivos a anti-Jo-1, por lo que se exploró si existían diferencias en la actividad del inflamasoma entre estos anticuerpos, sin que esto fuera observado.

La principal diferencia entre los valores de las citocinas fue en IL-1 β , con una mediana en anti-Jo-1 de 5.78 (2.30–14.57) pg./ml, en anti-PL 7/ anti-P-12, la mediana fue de 1.19 (0.55 – 2.43) pg./ml y en el grupo anti EJ/OJ, fue 0.5 (0.39 – 2.17) pg./ml. Sin embargo, en el análisis de varianza de Kruskal Wallis, no existió una diferencia estadística ($p = 0.18$), Se exploró si entre los grupos anti-Jo-1 y anti PL7 / PL12, se observa una diferencia entre las medianas, pero esta no fue significativa ($p = 0.18$). En el resto de las citocinas y proteínas de la vía del inflamasoma, no se observó diferencias en los valores de las medianas o las pruebas estadísticas, que se describen en la tabla 6.

3.5 Análisis de asociación entre proteínas y citocinas del inflamasoma.

Existe una clara asociación entre las moléculas Caspasa 1, IL 18, IFN γ y LDH entre los sujetos del grupo SAS, lo cual podría estar asociado a la actividad de la vía del inflamasoma en dentro de este grupo de pacientes.

Se evaluó la asociación entre las moléculas de cada grupo por medio de la Rho de Spearman. En los pacientes del grupo SAS, se observó asociación entre la Caspasa 1 y LDH (Rho de 0.58, $p = 0.008$). IL-18, y LDH (Rho 0.55, $P = 0.01$) y la LDH con IFN γ (Rho 0.67, $p = 0.001$). En este mismo grupo, se observó que NLRP3 y LDH

SAS presentan una asociación inversa (Rho -0.42, p = 0.07) la cual resulta significativa. En el grupo SSc solo se observó correlación con IL-18 e IFN γ . El resto de los coeficientes se presentan en la tabla 3.

4. DISCUSION

En este trabajo diseñado para explorar la relación entre el inflamasoma de NLRP3 y el SAS, por primera vez se demostró la activación de esta vía inflamatoria del sistema inmune innato en esta entidad autoinmune. El SAS, se ha descrito como una enfermedad que presenta diferentes fenotipos ²¹, los pacientes con positividad a anti-Jo1, se caracterizan más frecuentemente por artritis, miositis, y tiene un mejor pronóstico que los pacientes con SAS no Jo-1 positivos. En este trabajo el 64 %, de los pacientes son positivos a anti PL7/PL12, y solo el 22 % (n= 4) son positivos a anti-JO -1. Los pacientes anti-PL7/anti-PL12, tiene una presentación clínica asociada a EPID al momento del diagnóstico del 90%. Lo que es mayor que la prevalencia de EPID en pacientes con anti-JO-1 60%. También se ha reportado que los pacientes anti-PL7/anti-PL12 tienen mayor progresión de la EPID durante el seguimiento ²². En los pacientes anti-PL-7, se ha descrito una mayor expresión de las citocinas de la vía Th 17, lo que incluye IL-1 β e IL-18, las cuales son moléculas relacionadas a la actividad del inflamasoma ⁹. Sin embargo, al comparar el desenlace de los diferentes tipos de autoantígenos, no existen diferencias en los patrones tomográficos, el predominio tomográfico de la EPID (fibrótica o inflamatoria) o en el deterioro de la función pulmonar y progresión entre los pacientes del grupo SAS ^{23, 24}. Estos trabajos previos, validan los resultados

encontrados en este trabajo, donde se observó un predominio de un solo auto anticuerpo (anti-PL7)

Previamente se han explorado los factores asociados a la progresión de la enfermedad pulmonar en los pacientes con SAS. Nuestro grupo observó que los pacientes con mayores concentraciones de las citocinas del perfil TH17 (IL-1 β , IL-18) tienen progresión de la enfermedad pulmonar intersticial⁹. Estas citocinas inflamatorias son producto de la activación del inflamasoma¹⁰. Múltiples trabajos han descrito la actividad del inflamasoma en las enfermedades infecciosas y en años recientes ha aumentado el interés en la respuesta inmune innata en las otras enfermedades²⁵. Se ha descrito previamente que la activación del inflamasoma es un paso esencial que induce la respuesta inflamatoria en macrófagos, los cuales son células de doble acción. Incrementando la fagocitosis y la reparación de tejidos. Sin embargo, la activación crónica de estas células favorece el proceso de fibrosis en los tejidos, lo que es un importante factor de riesgo de las enfermedades inflamatorias y autoinmunes²⁶. Por tanto, la activación crónica y no controlada del inflamasoma podría jugar un rol crítico en la fisiopatología de las enfermedades reumáticas. El presente estudio se diseñó para describir si el daño pulmonar de los pacientes con SAS se encuentra asociado a las vías de activación del inflamasoma de NLRP3, evaluamos las concentraciones de las citocinas y el producto de liberación final de la muerte celular por piroptosis celular (LDH).

El inflamasoma es un complejo proteínico intracelular, involucrado en la respuesta inflamatoria asociado a PAMPs y DAMPs²⁷, que son parte de los activadores de la inmunidad innata. Siendo una de las principales características de su activación la

presencia de fiebre recurrente y la destrucción de los tejidos involucrados, secundario a la piroptosis celular derivada de la actividad del inflamasoma²⁸. Uno de los principales sensores capaces de iniciar a la inmunidad innata e inducir un puente de activación al sistema adaptativo son las proteínas NLRP (Receptores tipo NOD asociados a un dominio pirina). En conjunto con el adaptador proteico ASC (apoptosis associated speck-like protein), forman un complejo de transmisión con la pro-caspasa 1²⁷ esta última proteína, una vez activa induce la transformación de pro-IL-1 β y pro-IL-18 hacia sus formas efectoras extracelulares (IL-1 β e IL-18)²⁹.

En este trabajo se decidió usar un grupo de pacientes control con EPID asociada a esclerodermia, con base en la descripción de la inmunopatogénesis, se ha documentado que no está asociado a las vías de activación del inflamasoma³⁰. Sin embargo, estudios de variantes genéticas describen que, en los pacientes con esclerodermia, puede existir actividad del NLRP1, lo que se asocia con la expresión del rs8182352, lo cual se puede asociar a EPID en los pacientes con esclerodermia; Sin embargo, en este estudio se comparó con población sana, por edad y raza, y no se realizaron determinaciones de las moléculas del inflamasoma³¹. Bajo estas características es difícil establecer el rol de este mecanismo de la inmunidad innata. Diferentes estudios sugieren la importancia de los receptores tipo Toll, (TLR) en las fases iniciales de la SSc³⁰. Particularmente los TLR4 endógenos, incluyendo los de fibronectina, fragmentos hialurónicos, proteínas de choque térmico (HSP) 70, HSP 9, HMGB-1 (high-mobility group box-1) y las proteínas S100A, los cuales puede unirse al TLR4. El cual se encuentra presente en la piel y en el pulmón de pacientes con SSc y tiene sinergia con TGF- β para incrementar la producción de fibroblastos³².

³³, induciendo los fenotipos fibrosantes observados en estos pacientes³⁴. A diferencia de los pacientes con SAS, en quienes la inflamación sistémica y pulmonar es la principal característica que se observa tanto en los patrones tomográficos y del LBA con predominio linfocítico. Siendo esta inflamación mediada por un perfil TH17⁹. Nuestros resultados confirman que, en comparación con los pacientes con esclerodermia, en el SAS se genera activación del inflamasoma, que se demuestra por la diferencia de los niveles de Caspasa-1 y DHL entre grupos como respuesta de la piroptosis, lo cual fue medible en el lavado bronquiolo alveolar.

Este reporte es el primero en describir con evidencia de que el inflamasoma se encuentra activo en los pacientes con SAS. Este hallazgo suma a otros reportes en los cuales se describen en otras enfermedades autoinmunes como Lupus³⁵, artritis reumatoide²⁶ y síndrome de Sjögren³⁶. En lo que concierne a las citocinas, IL1- β y TGF- β , son factores asociados a angiogénesis y a la proliferación de fibroblastos en la sinovia articular en los pacientes con artritis reumatoide³⁷. Se ha reportado previamente que estas citocinas son potenciadoras de la respuesta inflamatoria asociada a la activación del inflamasoma por las citocinas Th1 y Th17^{38, 39}. Estos mecanismos inmunológicos pueden estar involucrados en los hallazgos clínicos de las diferentes etapas del síndrome antisintetasa.

En los pacientes en este estudio, determinamos las concentraciones de LDH en el LBA, lo cual refleja la piroptosis en los pulmones del grupo con SAS. Esta descrito que la LDH incrementa la interacción entre NK-kB/NLRP3, favoreciendo la transición epitelio mesenquimal⁴⁰. De hecho, se ha documentado que la actividad de NLRP3 regula la polarización de los macrófagos M2, a través de actividad de IL-4, lo cual

favorece la inflamación crónica e inicia la progresión de la fibrosis⁴¹. Por medio del análisis de las concentraciones de diferentes moléculas relacionadas a la actividad del inflamasoma, encontramos que la LDH está asociada en el grupo SAS a la Caspasa 1, IL-18 y e inversamente a NLRP3, sin observar este fenómeno en pacientes con SSc. Sin embargo, y más allá de la descripción estadística, existe sentido biológico al observar que existe presencia de LDH como consecuencia de la muerte celular por piroptosis, y de las otras proteínas reguladoras de la vía del inflamasoma en el LBA en los pacientes con SAS.

Finalmente, las concentraciones de NLRP3 en el LBA sorpresivamente no hubo diferencia entre grupos; Sin embargo, es probable que la diferencia no se encuentre en la cantidad de la enzima producida, si no en la actividad de esta y las moléculas producidas. Esto lo describió Carvalho y cols. En un modelo de leishmaniasis en roedores, donde compararon animales infectados con controles no infectados, observando que no hubo sobreexpresión del NLRP3, pero si existió activación del inflamasoma, demostrado por la producción de citocinas y medición de la LDH liberada⁴²

Entre las fortalezas de este trabajo, consideramos que a pesar de que el SAS es una entidad rara, el número de pacientes por cada grupo es adecuado y los resultados son representativos. Por otro lado, las determinaciones para la exploración de la actividad del inflamasoma fueron hechas directamente en los pulmones, lo cual es una ventaja de nuestro trabajo ya que esto refleja la actividad de las citocinas y proteínas del inflamasoma en el sitio de la enfermedad intersticial

asociada al SAS, mientras que las muestras séricas no necesariamente representan siempre la actividad en el sitio blanco. Este estudio no está libre de limitaciones, siendo el principal la baja representación de pacientes positivos a Jo-1, los cuales son el principal del auto anticuerpo en el SAS. Sin embargo, existe representación de los anticuerpos principales (anti-PL-7, anti-PL1-12y Jo-1) y solo existió diferencia numérica en IL-1 β en los pacientes Jo-1 pero esto no se representó estadísticamente entre grupos. Es posible que un mayor reclutamiento de pacientes modifique esta tendencia.

Varios factores determinan la presentación clínica de los pacientes con SAS, siendo estos asociados al tipo de auto anticuerpos que se encuentre predominante en cada paciente. En el presente trabajo se demostró que no solo elementos relacionados con los linfocitos son determinantes en esta entidad autoinmune, sino que también, mecanismos de la inmunidad innata como los inflamasomas y las moléculas derivadas de estos, están involucradas en la activación de la enfermedad y la progresión a formas terminales de la enfermedad intersticial.

En conclusión, este estudio demuestra la participación del sistema inmune innato en la fisiopatología del SAS, por la vía del inflamasoma, que puede dar lugar a un proceso inflamatorio crónico con el desarrollo subsecuente de un fenómeno autoinmune y muerte celular por piroptosis.

5.- Material suplementario

Tablas

Tabla 1. Descripción general de la población reclutada.			
Características epidemiológicas y comorbilidades en ambos grupos.			
Variable	SAS n = 19	SSc n = 17	Valor de P.
Género femenino	12 (63%)	12 (70%)	0.7
Edad (años)	63 (52 – 69)	65 (63 – 70)	0.15
Hipertensión arterial.	6(31%)	5(26%)	0.61
Diabetes tipo 2.	4 (22%)	6 (33%)	0.35
Obesidad	5 (26%)	2 (10%)	0.26
Hipertensión pulmonar	3 (15%)	3 (15%)	0.67
Características clínicas de ambos grupos.			
Fiebre	5 (27%)	0	0.047
Tos	15 (83%)	15 (83%)	0.73
Disnea	16 (88%)	15(83%)	0.54
Manos de mecánico	6 (33%)	0	0.02
artralgias	6 (33%)	4 (22%)	0.71
Debilidad muscular	5 (26%)	1(6%)	0.18
Xerostomía.	7 (38%)	7 (38%)	0.92
Disfagia.	0	4 (23%)	0.02
Esclerosis cutánea.	0	5 (29%)	0.01
Dedos de tambor.	3 (16%)	4 (24%)	0.56
Características de lavado bronquiolo alveolar.			
Macrófagos (%)	76 (45-90)	90 (81-94)	0.02
Linfocitos. (%)	22 (9.5 -43)	9.75 (5 – 18)	0.03
Neutrófilos. (%)	0 (0 – 0.5)	0 (0 – 1)	0.1
Eosinófilos. (%)	0.25 (0 – 1.5)	0.25 (0 – 0.75)	0.7
Características de las pruebas de función pulmonar en ambos grupos.			
Valores de la espirometría al momento del diagnóstico.			
	SAS n = 19	SSc n = 17	Valor de P.
Relación VEF 1/CVF	87(80 – 95)	92 (10 – 110)	0.67
CVF			
Litros.	1.93 (1.24 – 2.85)	1.78 (1.39 – 2.07)	0.31
Porcentaje del predicho	65 (51 – 86)	57 (48- 79)	0.64
Volumen espirado forzado.			
litros	1.49 (1.17 – 2.09)	1.56 (1.15 - 1.77)	0.81

Porcentaje del predicho	69 (57 – 88)	71.6 (56 – 92)	0.78
DLCOSb	(n= 15)	(n= 16)	
Ajuste al valor predicho	57 (44 – 80)	52 (36 – 72)	0.42
C6M	(n= 17)	(n=13)	
Mejor distancia recorridas (m)	355 (240 – 396)	355 (298 – 424)	0.30
Descripción del puntaje de Gho para inflamación y fibrosis			
Extensión tomográfica	SAS n= 19	SSc n= 17	Val de p.
Extension total	74% (48% – 82%)	60% (54% – 68%)	0.32
Extensión de inflamación por Gho	76% (54% – 82%)	28% (22% – 34%)	0.01
Extensión de fibrosis por Gho	24% (18% – 46%)	72% (66% – 78%)	0.01

SAS: Síndrome anti-sintetasa, SSc: Esclerodermia sistémica, CVF: Capacidad vital forzada, VEF1: Volumen espirado forzado 1s, Rel. CVF/VEF1: Relación de capacidad vital forzada/Volumen espirado forzado1seg, DLCOSb: Difusión de monoóxido de carbono en respiración única. C6M: Caminata de 6 minutos.

Table 2.

Tabla 2. Perfil de auto anticuerpos de los pacientes reclutados.			
Auto anticuerpo	SAS (n=19)	SSc (n=17)	Valor de p.
Anti- Jo 1	4 (22%)	0	0.06
Anti-OJ	6 (33%)	0 (0%)	0.014
Anti-pl7	8(42%)	0	0.002
Anti-pl12	4(22%)	0	0.06
Anti-ej	3(11%)	0	0.13
Anti-PM SCL-75	3(16%)	1(5.5%)	0.34
Anti-Mi 2- b	3(16%)	3(17%)	0.61
Anti-PM SCL-100	2(11%)	2(12%)	0.67
Anti- TH/To	1(5.5%)	12(70%)	>0.001
Anti-Fibrilarina	1(5.5%)	5(29%)	0.067
Anti-Ro52	3(16%)	2(11%)	0.55
Anti-Nor90	1(5.5%)	4(23%)	0.13
Anti-SCL-70	0	2(11%)	0.21

Tabla 3. Valores de correlación entre las citocinas y proteínas de la vía del inflammasoma.

Variable	SAS. n = 19	SSc n = 17	Valor de P
LDH	0.15 (0.14 – 0.19)	0.09 (0.09 – 0.10)	< 0.001
Caspasa 1	1.25 (1.15- 1.35)	0.75 (0.62 – 1.14)	0.003
NLRP3	10.34 (9.76 – 10.93)	10.69 (10.34 – 13.02)	0.15
Il-1 b	1.44 (0.5 – 4.1)	0.58 (0.45 – 1.11)	0.07
IL-18	1.42 (0.98 – 2.65)	0.87 (0.62 – 1.14)	0.02
IFNγ	0.9 (0.9 – 1.09)	0.86 (0.81 – 0.95)	0.01
IL-2	0.75 (0.75- 0.79)	0.75 (0.71 – 0.79)	0.87
IL-4	0.31 (0.26- 0.46)	0.29 (0.22 – 0.36)	0.25
TNF α	0.47 (0.38 – 0.69)	0.45 (0.38 – 0.52)	0.50
IL-12	0.41 (0.36 – 0.45)	0.38 (0.34 – 0.39)	0.11
IL-6 (n=18/15)	7.9 (4.4 – 21.24)	8.18 (5.77 – 28.84)	0.61
IL-5 (n=13/5)	0.33 (0.13 – 0.64)	0.34 (0.33 – 0.44)	0.72
IL-13 (n=2/0)	0.14 (0.14 – 0.31)	-	-

(-) Valor inferior al limite inferior de detección de la prueba.

Tabla 4. Valores de las correlaciones entre las proteínas y las citocinas de la vía del inflammasoma.

Variable	Todos (n= 38)	SAS (n= 19)	SSc (n=17)
Caspase 1 /LDH	Rho = 0.59 p = 0.0001	Rho = 0.58 p = 0.008	Rho = 0.15 p = 0.56
NLRP3 / LDH	Rho = -0.32 p = 0.05	Rho = -0.42 p = 0.07	Rho = -0.06 p = 0.81
IL-18 / LDH	Rho = 0.55 p = 0.0004	Rho = 0.55 p = 0.01	Rho = 0.39 p = 0.11
IL-1 b / IL-18	Rho = 0.69 p = >0.001	Rho = 0.60 p = 0.006	Rho = 0.72 p = 0.001
IFNγ / IL-18	Rho = 0.57 p = >0.001	Rho = 0.67 p = 0.001	Rho = 0.24 p = 0.33
Caspasa 1 / IL-1b	Rho = 0.43 p = 0.007	Rho = 0.34 p = 0.14	Rho = 0.28 p = 0.25
Caspasa 1 / IL-18	Rho = 0.69 p = 0.001	Rho = 0.19 p = 0.42	Rho = 0.40 p = 0.10
NLRP3 / Caspasa 1	Rho = -0.15 p = 0.38	Rho = -0.27 p = 0.27	Rho = 0.11 p = 0.65
NLRP 3 / IL-1 b	Rho = -0.10 p = 0.55	Rho = 0.06 p = 0.80	Rho = -0.12 p = 0.63
NLRP3 / IL-18	Rho = -0.17 p = 0.30	Rho = - 0.29 p = 0.23	Rho = 0.15 p = 0.56
IL.1 b / LDH	Rho = 0.36 p = 0.02	Rho = 0.26 p = 0.26	Rho = 0.15 p = 0.55

Table 5. Análisis de correlación entre los valores de Gho y las citocinas en ambos grupos.

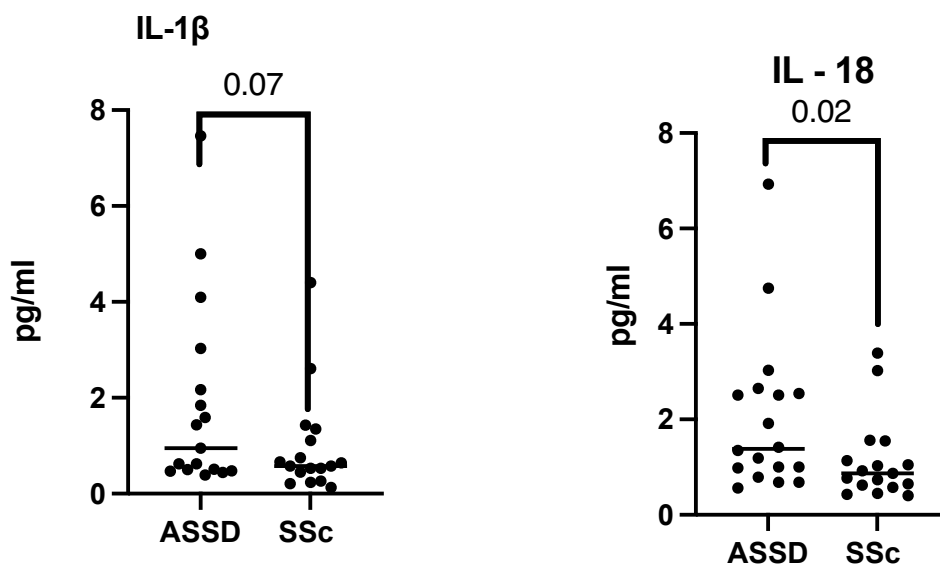
Variable	Ambos grupos n = 36	SAS n = 19	SSc n = 17
Extensión de Gho /IL-18	Rho = -0.27 p = 0.09	Rho = -0.54 p = 0.01	Rho = -0.22 p = 0.38
Extensión de Gho /NLRP3	Rho = 0.04 p = 0.78	Rho = 0.53 p = 0.02	Rho = -0.48 p = 0.05
Extensión de Gho / Linfocitos en el LBA	Rho = 0.39 p = 0.01	Rho = 0.43 p = 0.06	Rho = -0.14 p = 0.57

Tabla 6. Descripción de las citocinas y proteínas asociadas a las vías del inflammasoma entre los diferentes autoanticuerpos en el grupo SAS.

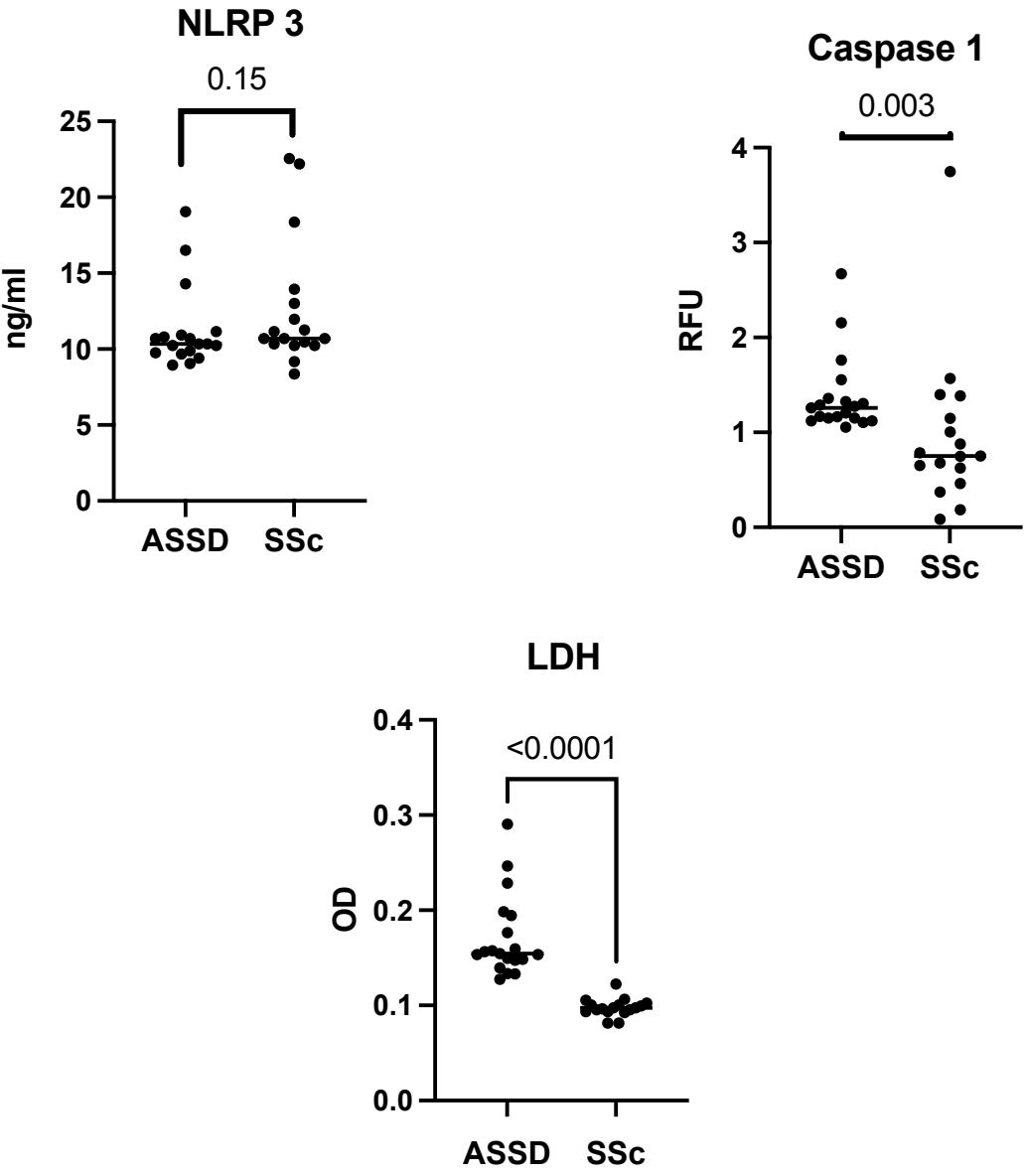
Variable	Anti-Jo-1. n = 4	Anti-PL 7 n = 8	Anti- PI12 N = 4	Anti- EJ n = 3	Kruskal- Wallis
LDH	0.15 (0.15 – 0.22)	0.13 (0.13 – 0.17)	0.17(0.15 – 0.22)	0.14 (0.13 – 0.15)	p = 0.42
Caspasa 1	1.29 (1.28- 1.72)	1.14 (1.11 – 1.26)	1.17 (1.15 – 1.93)	1.29 (1.25 – 1.32)	p = 0.22
NLRP3	10.52 (9.95 – 13.66)	10.34 (9.88 – 11.16)	10.51(9.64 – 10.81)	14.41 (9.76 – 19.06)	p = 0.65
Il-1 b	5.78 (2.30 – 14.57)	0.62 (0.47 – 1.27)	4.01 (2.23 – 22.6)	0.44 (0.39 – 0.5)	p = 0.03
IL-18	1.65 (0.73 – 3.63)	1.09 (0.99 – 1.67)	4.79 (2.59 – 161.7)	0.95 (0.56 – 1.35)	p = 0.08
IFN γ	0.94 (0.81 – 1.07)	0.90 (0.90 – 0.96)	1.16 (1.02 – 3.82)	0.99 (0.94 – 1.05)	p = 0.08

Images.

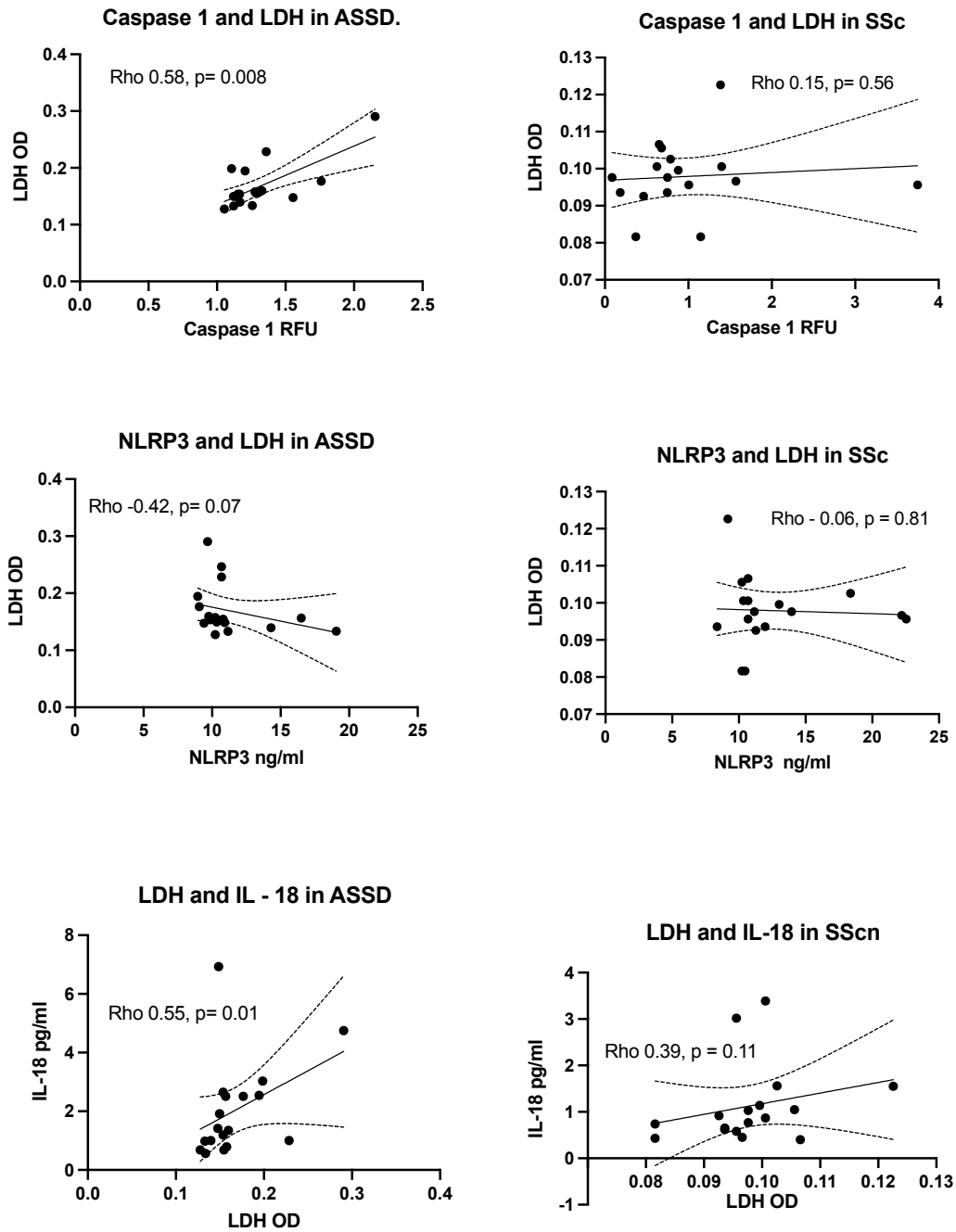
Gráfica 1. Comparación entre grupos por Blox Plot entre grupos de las Interleucinas IL-1b e IL-18.



Gráfica 2. Comparación entre grupos por Blox Plot entre grupos de las proteínas de las vías de activación del inflamasoma y el valor de LDH en él LBA.



Gráfica 3. Graficas de dispersión de las correlaciones entre las diferentes citocinas y proteínas de la vía del inflammasoma entre grupos.



5. Referencias.

1. Patel, H. C.; Lauder, N. N., The antisynthetase syndrome. *Am J Med* **2011**, *124* (9), e3-4.
2. Witt, L. J.; Curran, J. J.; Streck, M. E., The Diagnosis and Treatment of Antisynthetase Syndrome. *Clin Pulm Med* **2016**, *23* (5), 218-226.
3. Debray, M. P.; Borie, R.; Revel, M. P.; Naccache, J. M.; Khalil, A.; Toper, C.; Israel-Biet, D.; Estellat, C.; Brillet, P. Y., Interstitial lung disease in anti-synthetase syndrome: initial and follow-up CT findings. *Eur J Radiol* **2015**, *84* (3), 516-523.
4. Gonzalez-Perez, M. I.; Mejia-Hurtado, J. G.; Perez-Roman, D. I.; Buendia-Roldan, I.; Mejia, M.; Falfan-Valencia, R.; Mateos-Toledo, H. N.; Rojas-Serrano, J., Evolution of Pulmonary Function in a Cohort of Patients with Interstitial Lung Disease and Positive for Antisynthetase Antibodies. *J Rheumatol* **2020**, *47* (3), 415-423.
5. Danoff, S. K.; Casciola-Rosen, L., The lung as a possible target for the immune reaction in myositis. *Arthritis Res Ther* **2011**, *13* (4), 230.
6. Ponce-Gallegos, M. A.; Ramos-Martinez, E.; Garcia-Carmona, A.; Mejia, M.; Nava-Quiroz, K. J.; Perez-Rubio, G.; Ambrocio-Ortiz, E.; Gonzalez-Perez, M. I.; Buendia-Roldan, I.; Rojas-Serrano, J.; Falfan-Valencia, R., Genetic Susceptibility to Antisynthetase Syndrome Associated With Single-Nucleotide Variants in the IL1B Gene That Lead Variation in IL-1beta Serum Levels. *Frontiers in medicine* **2020**, *7*, 547186.
7. Levine, S. M.; Raben, N.; Xie, D.; Askin, F. B.; Tuder, R.; Mullins, M.; Rosen, A.; Casciola-Rosen, L. A., Novel conformation of histidyl-transfer RNA synthetase in the lung: the target tissue in Jo-1 autoantibody-associated myositis. *Arthritis and rheumatism* **2007**, *56* (8), 2729-39.
8. Howard, O. M.; Dong, H. F.; Yang, D.; Raben, N.; Nagaraju, K.; Rosen, A.; Casciola-Rosen, L.; Hartlein, M.; Kron, M.; Yang, D.; Yiadom, K.; Dwivedi, S.; Plotz, P. H.; Oppenheim, J. J., Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med* **2002**, *196* (6), 781-91.
9. Ramos-Martinez, E.; Falfan-Valencia, R.; Perez-Rubio, G.; Mejia, M.; Buendia-Roldan, I.; Gonzalez-Perez, M. I.; Mateos-Toledo, H. N.; Rojas Serrano, J., Anti-Aminoacyl Transfer-RNA-Synthetases (Anti-tRNA) Autoantibodies Associated with Interstitial Lung Disease: Pulmonary Disease Progression has a Persistent Elevation of the Th17 Cytokine Profile. *J Clin Med* **2020**, *9* (5).
10. Hoffman, H. M.; Wanderer, A. A., Inflammasome and IL-1beta-mediated disorders. *Curr Allergy Asthma Rep* **2010**, *10* (4), 229-35.
11. Miao, E. A.; Leaf, I. A.; Treuting, P. M.; Mao, D. P.; Dors, M.; Sarkar, A.; Warren, S. E.; Wewers, M. D.; Aderem, A., Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* **2010**, *11* (12), 1136-42.
12. Cottin, V.; Brown, K. K., Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis (SSc-ILD). *Respir Res* **2019**, *20* (1), 13.
13. Dantas, A. T.; Almeida, A. R.; Sampaio, M.; Cordeiro, M. F.; Oliveira, P. S. S.; Mariz, H. A.; Pereira, M. C.; Rego, M.; Pitta, I. D. R.; Duarte, A.; Pitta, M., Different profile of cytokine production in patients with systemic sclerosis and association with clinical manifestations. *Immunol Lett* **2018**, *198*, 12-16.
14. Gallay, L.; Gayed, C.; Hervier, B., Antisynthetase syndrome pathogenesis: knowledge and uncertainties. *Curr Opin Rheumatol* **2018**, *30* (6), 664-673.
15. Johnson, S. R., New ACR EULAR guidelines for systemic sclerosis classification. *Curr Rheumatol Rep* **2015**, *17* (5), 32.

16. Graham, B. L.; Steenbruggen, I.; Miller, M. R.; Barjaktarevic, I. Z.; Cooper, B. G.; Hall, G. L.; Hallstrand, T. S.; Kaminsky, D. A.; McCarthy, K.; McCormack, M. C.; Oropez, C. E.; Rosenfeld, M.; Stanojevic, S.; Swanney, M. P.; Thompson, B. R., Standardization of Spirometry 2019 Update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. *Am J Respir Crit Care Med* **2019**, *200* (8), e70-e88.
17. Laboratories, A. T. S. C. o. P. S. f. C. P. F., ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**, *166* (1), 111-7.
18. Graham, B. L.; Brusasco, V.; Burgos, F.; Cooper, B. G.; Jensen, R.; Kendrick, A.; MacIntyre, N. R.; Thompson, B. R.; Wanger, J., 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* **2017**, *49* (1).
19. Demedts, M.; Costabel, U., ATS/ERS international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* **2002**, *19* (5), 794-6.
20. Liaskos, C.; Marou, E.; Simopoulou, T.; Gkoutzourelas, A.; Barmakoudi, M.; Efthymiou, G.; Scheper, T.; Meyer, W.; Katsiari, C. G.; Bogdanos, D. P.; Sakkas, L. I., Multiparametric autoantibody profiling of patients with systemic sclerosis in Greece. *Mediterr J Rheumatol* **2018**, *29* (3), 120-126.
21. Marie, I.; Josse, S.; Decaux, O.; Dominique, S.; Diot, E.; Landron, C.; Roblot, P.; Jouneau, S.; Hatron, P. Y.; Tiev, K. P.; Vittecoq, O.; Noel, D.; Mouthon, L.; Menard, J. F.; Jouen, F., Comparison of long-term outcome between anti-Jo1- and anti-PL7/PL12 positive patients with antisynthetase syndrome. *Autoimmunity reviews* **2012**, *11* (10), 739-45.
22. Marie, I.; Josse, S.; Decaux, O.; Diot, E.; Landron, C.; Roblot, P.; Jouneau, S.; Hatron, P. Y.; Hachulla, E.; Vittecoq, O.; Menard, J. F.; Jouen, F.; Dominique, S., Clinical manifestations and outcome of anti-PL7 positive patients with antisynthetase syndrome. *European journal of internal medicine* **2013**, *24* (5), 474-9.
23. Mejia, M.; Herrera-Bringas, D.; Perez-Roman, D. I.; Rivero, H.; Mateos-Toledo, H.; Castorena-Garcia, P.; Figueroa, J. E.; Rojas-Serrano, J., Interstitial lung disease and myositis-specific and associated autoantibodies: Clinical manifestations, survival and the performance of the new ATS/ERS criteria for interstitial pneumonia with autoimmune features (IPAF). *Respiratory medicine* **2017**, *123*, 79-86.
24. Cavagna, L.; Trallero-Araguas, E.; Meloni, F.; Cavazzana, I.; Rojas-Serrano, J.; Feist, E.; Zanframundo, G.; Morandi, V.; Meyer, A.; Pereira da Silva, J. A.; Matos Costa, C. J.; Molberg, O.; Andersson, H.; Codullo, V.; Mosca, M.; Barsotti, S.; Neri, R.; Scire, C.; Govoni, M.; Furini, F.; Lopez-Longo, F. J.; Martinez-Barrio, J.; Schneider, U.; Lorenz, H. M.; Doria, A.; Ghirardello, A.; Ortego-Centeno, N.; Confalonieri, M.; Tomietto, P.; Pipitone, N.; Rodriguez Cambron, A. B.; Blazquez Canamero, M. A.; Voll, R. E.; Wendel, S.; Scarpato, S.; Maurier, F.; Limonta, M.; Colombelli, P.; Giannini, M.; Geny, B.; Arrigoni, E.; Bravi, E.; Migliorini, P.; Mathieu, A.; Piga, M.; Drott, U.; Delbrueck, C.; Bauhammer, J.; Cagnotto, G.; Vancheri, C.; Sambataro, G.; De Langhe, E.; Sainaghi, P. P.; Monti, C.; Gigli Berzolari, F.; Romano, M.; Bonella, F.; Specker, C.; Schwarting, A.; Villa Blanco, I.; Selmi, C.; Ceribelli, A.; Nuno, L.; Mera-Varela, A.; Perez Gomez, N.; Fusaro, E.; Parisi, S.; Sinigaglia, L.; Del Papa, N.; Benucci, M.; Cimmino, M. A.; Riccieri, V.; Conti, F.; Sebastiani, G. D.; Iuliano, A.; Emmi, G.; Cammelli, D.; Sebastiani, M.; Manfredi, A.; Bachiller-Corral, J.; Sifuentes Giraldo, W. A.; Paolazzi, G.; Saketkoo, L. A.; Giorgi, R.; Salaffi, F.; Cifrian, J.; Caporali, R.; Locatelli, F.; Marchioni, E.; Pesci, A.; Dei, G.; Pozzi, M. R.; Claudia, L.; Distler, J.; Knitza, J.; Schett, G.; Iannone, F.; Fornaro, M.; Franceschini, F.; Quartuccio, L.; Gerli, R.; Bartoloni, E.; Bellando Randone, S.; Zampogna, G.; Gonzalez Perez, M. I.; Mejia, M.; Vicente, E.; Triantafyllias, K.; Lopez-Mejias, R.; Matucci-Cerinic, M.; Selva-O'Callaghan, A.; Castaneda, S.; Montecucco, C.; Gonzalez-Gay, M. A., Influence of Antisynthetase Antibodies Specificities on Antisynthetase Syndrome Clinical Spectrum Time Course. *J Clin Med* **2019**, *8* (11).

25. Yang, Q.; Liu, R.; Yu, Q.; Bi, Y.; Liu, G., Metabolic regulation of inflammasomes in inflammation. *Immunology* **2019**, *157* (2), 95-109.
26. Yi, Y. S., Role of inflammasomes in inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* **2018**, *22* (1), 1-15.
27. Evavold, C. L.; Kagan, J. C., How Inflammasomes Inform Adaptive Immunity. *Journal of molecular biology* **2018**, *430* (2), 217-237.
28. Hayward, J. A.; Mathur, A.; Ngo, C.; Man, S. M., Cytosolic Recognition of Microbes and Pathogens: Inflammasomes in Action. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **2018**, *82* (4).
29. Alehashemi, S.; Goldbach-Mansky, R., Human Autoinflammatory Diseases Mediated by NLRP3-, Pyrin-, NLRP1-, and NLRC4-Inflammasome Dysregulation Updates on Diagnosis, Treatment, and the Respective Roles of IL-1 and IL-18. *Frontiers in immunology* **2020**, *11*, 1840.
30. Pattanaik, D.; Brown, M.; Postlethwaite, B. C.; Postlethwaite, A. E., Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Frontiers in immunology* **2015**, *6*, 272.
31. Dieude, P.; Guedj, M.; Wipff, J.; Ruiz, B.; Riemekasten, G.; Airo, P.; Melchers, I.; Hachulla, E.; Cerinic, M. M.; Diot, E.; Hunzelmann, N.; Caramaschi, P.; Sibilia, J.; Tiev, K.; Mouthon, L.; Riccieri, V.; Cracowski, J. L.; Carpentier, P. H.; Distler, J.; Amoura, Z.; Tarner, I.; Avouac, J.; Meyer, O.; Kahan, A.; Boileau, C.; Allanore, Y., NLRP1 influences the systemic sclerosis phenotype: a new clue for the contribution of innate immunity in systemic sclerosis-related fibrosing alveolitis pathogenesis. *Annals of the rheumatic diseases* **2011**, *70* (4), 668-74.
32. O'Reilly, S., Innate immunity in systemic sclerosis pathogenesis. *Clinical science* **2014**, *126* (5), 329-37.
33. Okamura, Y.; Watari, M.; Jerud, E. S.; Young, D. W.; Ishizaka, S. T.; Rose, J.; Chow, J. C.; Strauss, J. F., 3rd, The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276* (13), 10229-33.
34. Bhattacharyya, S.; Kelley, K.; Melichian, D. S.; Tamaki, Z.; Fang, F.; Su, Y.; Feng, G.; Pope, R. M.; Budinger, G. R.; Mutlu, G. M.; Lafyatis, R.; Radstake, T.; Feghali-Bostwick, C.; Varga, J., Toll-like receptor 4 signaling augments transforming growth factor-beta responses: a novel mechanism for maintaining and amplifying fibrosis in scleroderma. *The American journal of pathology* **2013**, *182* (1), 192-205.
35. Wong, C. K.; Ho, C. Y.; Li, E. K.; Tam, L. S.; Lam, C. W., Elevated production of interleukin-18 is associated with renal disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology* **2002**, *130* (2), 345-51.
36. Kiripolsky, J.; McCabe, L. G.; Kramer, J. M., Innate immunity in Sjogren's syndrome. *Clinical immunology* **2017**, *182*, 4-13.
37. Gonzalo-Gil, E.; Galindo-Izquierdo, M., Role of transforming growth factor-beta (TGF) beta in the physiopathology of rheumatoid arthritis. *Reumatologia clinica* **2014**, *10* (3), 174-9.
38. Harden, L. M.; du Plessis, I.; Poole, S.; Laburn, H. P., Interleukin (IL)-6 and IL-1 beta act synergistically within the brain to induce sickness behavior and fever in rats. *Brain, behavior, and immunity* **2008**, *22* (6), 838-49.
39. Mansoori, M. N.; Shukla, P.; Kakaji, M.; Tyagi, A. M.; Srivastava, K.; Shukla, M.; Dixit, M.; Kureel, J.; Gupta, S.; Singh, D., IL-18BP is decreased in osteoporotic women: Prevents Inflammasome mediated IL-18 activation and reduces Th17 differentiation. *Scientific reports* **2016**, *6*, 33680.
40. Alyaseer, A. A. A.; de Lima, M. H. S.; Braga, T. T., The Role of NLRP3 Inflammasome Activation in the Epithelial to Mesenchymal Transition Process During the Fibrosis. *Frontiers in immunology* **2020**, *11*, 883.

41. Liu, Y.; Gao, X.; Miao, Y.; Wang, Y.; Wang, H.; Cheng, Z.; Wang, X.; Jing, X.; Jia, L.; Dai, L.; Liu, M.; An, L., NLRP3 regulates macrophage M2 polarization through up-regulation of IL-4 in asthma. *The Biochemical journal* **2018**, *475* (12), 1995-2008.
42. de Carvalho, R. V. H.; Silva, A. L. N.; Santos, L. L.; Andrade, W. A.; de Sa, K. S. G.; Zamboni, D. S., Macrophage priming is dispensable for NLRP3 inflammasome activation and restriction of *Leishmania amazonensis* replication. *Journal of leukocyte biology* **2019**, *106* (3), 631-640.