

Universidad de Granada

Facultad de Medicina de Granada. Departamento de
Medicina



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA MOLÉCULA FGF-23 Y SU CORRECEPTOR KLOTTHO EN ESCLEROSIS SISTÉMICA.

Autor: Lucía María Cantero Nieto.

Directores: Dr. Norberto Ortego Centeno.

Dr. Antonio Álvarez de Cienfuegos Rodríguez.

*Programa de doctorado: MEDICINA CLÍNICA Y SALUD
PÚBLICA.*

2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Lucía María Cantero Nieto
ISBN: 978-84-1117-592-0
URI: <https://hdl.handle.net/10481/77983>

DEDICATORIA

A Rafa, sin él cual este proyecto no habría sido posible. Invertimos tiempo juntos en nuestro futuro y en ser mejores en todos los aspectos de nuestra vida. Gracias por ser mi compañero, gracias por tanta comprensión y cariño, gracias por empujarme a conseguir la mejor versión de mi misma.

A mis padres, Ramón y Susana, por darme una educación donde el esfuerzo siempre ha sido un pilar fundamental, gracias por enseñarme el valor del trabajo.

A mis hermanos, Álvaro y Beatriz, por vuestro apoyo, por vuestros ánimos, por ser ejemplos de constancia y lucha, que me han servido como motivación.

A Jordan, por enseñarme a valorar el tiempo, por tu lealtad, por alegrar cada uno de nuestros días.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, dar las gracias a las pacientes, que dan sentido a nuestra labor diaria, que sufren y confían al mismo tiempo y que tanto nos enseñan.

Gracias a Norberto, por tu paciencia infinita, por tu apoyo y motivación, por hacerlo todo tan fácil hasta el último momento.

Gracias a Antonio, por este recorrido juntos en la distancia, por aliviar tanto peso a este trabajo.

Gracias a Fernando y a Juan Diego, por abrirme vuestras puertas de vuestra Unidad, por ofrecerme vuestro tiempo y material, y facilitarme tanto el trabajo.

Gracias a Conchi y a Ana, y resto personal de enfermería, por vuestra colaboración continua y altruista, siempre con una sonrisa. Gracias a Nati por tu ayuda para reclutar controles.

Gracias a mis compañeros, tanto adjuntos como residentes del Hospital Virgen de las Nieves, por hacerlo todo siempre más fácil, por enseñarme tanto.

Gracias a mis amigos, a cada persona que me ha dedicado tiempo para animarme con sus palabras, por hacer que merezca la pena.

Y por último gracias a mi familia, a Rafa por apoyarme en todo momento, por ser tan paciente y por tu ayuda en los momentos más complicados. Gracias a mis padres y hermanos, y mi cuñada, por su apoyo incondicional y por confiar tanto en mi.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.

1. Esclerosis sistémica.

1.1. Reseña histórica y definición de la esclerosis sistémica.

1.2. Epidemiología de la esclerosis sistémica.

1.3. Fisiopatología de la esclerosis sistémica.

1.3.1. Factores genéticos y ambientales.

1.3.2. Patogenia.

1.4. Manifestaciones clínicas y pruebas diagnósticas de la esclerosis sistémica.

1.4.1. Afectación cutánea.

1.4.2. Afectación visceral.

1.4.3. Trastornos inmunológicos.

1.5. Criterios de clasificación de la esclerosis sistémica.

1.6. Tratamiento de la esclerosis sistémica.

1.7. Pronóstico de la esclerosis sistémica.

1.7.1. Causas de mortalidad en el síndrome de la esclerosis sistémica.

2. Marco teórico.

2.1. Riesgo cardiovascular en pacientes con esclerosis sistémica.

2.1.1. Riesgo vascular y aterosclerosis en la esclerosis sistémica.

2.1.2. Manifestaciones clínicas cardiovasculares en esclerosis sistémica.

2.1.3. Factores de riesgo cardiovascular clásicos en esclerosis sistémica.

2.1.4. Factores de riesgo cardiovascular relacionados con la esclerosis sistémica.

2.2. Osteoporosis en esclerosis sistémica.

2.3. FGF-23 y Klotho.

- 2.3.1. FGF-23 y Klotho.
- 2.3.2. FGF-23 y Klotho y riesgo cardiovascular.
- 2.3.3. FGF-23 y Klotho y osteoporosis.
- 2.3.4. FGF-23 y Klotho en esclerosis sistémica.

II. JUSTIFICACIÓN.

III. HIPÓTESIS.

IV. OBJETIVOS.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Diseño y tipo de estudio.
2. Población a estudio.
3. Variables del estudio.
 - 3.1. Variables sociodemográficas y antecedentes personales.
 - 3.2. Variables relacionadas con la esclerosis sistémica.
 - 3.3. Variables antropométricas.
 - 3.4. Variables exploratorias.
 - 3.5. Variables analíticas.
 - 3.6. Variables electrocardiográficas y ecocardiográficas.
 - 3.7. Variables para estudio de enfermedad ósea.
4. Recogida de datos.
5. Análisis estadístico.
6. Aspectos éticos.

VI. RESULTADOS.

1. Descripción de las características de las pacientes con esclerosis sistémica y de los controles.
 - 1.1. Características antropométricas.
 - 1.2. Comorbilidades y tratamiento habitual.

1.3. Resultados de laboratorio.

1.4. Estudio y factores de riesgo de enfermedad cardiovascular.

1.5. Estudio y factores de riesgo de osteoporosis.

2. Estadística comparativa. Análisis de resultados y correlaciones.

2.1 Estudio de FGF-23.

2.1.1. Correlación entre los niveles de FGF-23 y las características de la enfermedad en los pacientes con esclerosis sistémica.

2.1.2. Correlación entre los niveles de FGF-23 y los factores de riesgo cardiovascular en los pacientes con esclerosis sistémica.

2.1.3. Correlación entre los niveles de FGF-23 y los factores de riesgo de osteoporosis en los pacientes con esclerosis sistémica.

2.2 Estudio de Klotho.

2.2.1. Correlación entre los niveles de Klotho y las características de la enfermedad en los pacientes con esclerosis sistémica.

2.2.2. Correlación entre los niveles de Klotho y los factores de riesgo cardiovascular en los pacientes con esclerosis sistémica.

2.2.3. Correlación entre los niveles de Klotho, masa ósea y factores de riesgo de osteoporosis en los pacientes con esclerosis sistémica.

2.3 Estudio de endotelina-1 y su correlación con las características de la enfermedad, factores de riesgo cardiovascular y metabolismo óseo.

2.4 Estudio de homocisteína y su correlación con las características de la enfermedad, factores de riesgo cardiovascular y metabolismo óseo.

VII. DISCUSIÓN.

1. Análisis de las diferencias entre pacientes con esclerosis sistémica y controles.

2. Análisis de las diferencias entre subtipos de esclerosis sistémica.

3. Estudio de FGF-23.
 - 3.1 FGF-23 y manifestaciones de la enfermedad.
 - 3.2 FGF-23 y factores de riesgo cardiovascular.
 - 3.3 FGF-23 y metabolismo óseo.
4. Estudio de Klotho.
 - 4.1 FGF-23 y manifestaciones de la enfermedad.
 - 4.2 FGF-23 y factores de riesgo cardiovascular.
 - 4.3 FGF-23 y metabolismo óseo.
5. Estudio de la endotelina- 1.
6. Estudio de la homocisteína.

VIII. CONCLUSIONES.

IX. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

X. RESUMEN.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

XII. ANEXOS.

1. Abreviaturas
2. Consentimiento informado.
3. Copia íntegra del trabajo científico publicado.

I.INTRODUCCIÓN

1. Esclerosis sistémica.

1.1 Reseña histórica y definición de la esclerosis sistémica.

Existe registro de descripciones de enfermedades con características similares a la esclerosis sistémica (ES) desde la antigüedad. Los primeros posibles casos descritos, por Hipócrates y Galeno, reflejan las características clínicas más externas de la piel, destacando la tirantez, frialdad y dureza de la misma. Le han seguido múltiples descripciones a lo largo de la historia y diferentes nomenclaturas, siendo Fantonetti de Pavia, en el año 1836, el primero en denominarla *skleroderma* (1). A lo largo del siglo XIX, es cuando se comienzan a publicar series de dicha enfermedad con diferentes nombres. En 1896 J. Hutchinson la denominó *acroesclerodermia* y la asocia de forma directa con el fenómeno de Raynaud. Consecutivamente, se van describiendo toda la sintomatología y diferentes órganos implicados, hasta que en 1942 se describió un caso que asociaba calcinosis, fenómeno de Raynaud, disfunción esofágica y telangiectasias, que, en el año 1964, H.Winterbauer denominó *síndrome de CREST*. A raíz de una serie de autopsias clínicas, en 1969, se determina la afectación orgánica de la enfermedad y los hallazgos anatomopatológicos comenzaron a quedar establecidos. Posteriormente, se describe la presencia de anticuerpos antinucleares en estas pacientes y se descubren los antitopoisomerasa y anticentrómero, y en 1980, el American College of Rheumatology (ACR) la denomina finalmente *esclerosis sistémica*, tal y como la conocemos hoy día.

La esclerosis sistémica, también conocida como esclerodermia, es una enfermedad autoinmune sistémica, mediada por autoanticuerpos, que consiste en una vasculopatía y fibrosis generalizada que afecta a numerosos tejidos, entre los que se encuentran principalmente la piel y los vasos sanguíneos de pequeño tamaño, así como órganos internos, como los pulmones, riñones, y el sistema cardiovascular.

Los casos de esta enfermedad se han podido clasificar en cuatro tipos fundamentales basados en el tipo de afectación cutánea (2):

- Esclerosis sistémica limitada (ESL): afectación cutánea en zonas distales de miembros superiores e inferiores y cara. Presenta historia clínica de fenómeno de Raynaud de años de evolución, afectación visceral de aparición tardía, hipertensión pulmonar (HTP), calcinosis y enfermedad gastrointestinal, con escasa frecuencia de enfermedad renal. Presentan anticuerpos anticentrómero (AAC) en el 70-80% de los casos.

- Esclerosis sistémica difusa (ESD): presenta extensión proximal hasta codos y rodillas, cara, con incluso afectación del tronco. Puede tener afectación visceral rápidamente progresiva y grave. Presenta pérdida de capilares en la capilaroscopia y afectación visceral precoz, con alta incidencia de enfermedad renal y enfermedad pulmonar intersticial.

- Esclerosis sistémica sin esclerodermia (ESse): presenta fenómeno de Raynaud, afectación vascular y visceral, anticuerpos antinucleares (ANAs) positivos, pero sin afectación cutánea.

- Preesclerodermia (PreES): se caracteriza por la presencia de fenómeno de Raynaud, alteraciones capilares en la capilaroscopia y presencia de anticuerpos antipoisomera I (Scl-70), anticentrómero o anti ARN polimerasa I, II o III.

1.2. Epidemiología de la esclerosis sistémica.

La prevalencia y la incidencia son muy variables en función de que series consultemos. Puesto que se trata de una enfermedad con prevalencia baja y con características muy variadas, ha sido difícil definir unos criterios de clasificación universales, para identificar de forma correcta y uniforme a los pacientes. La prevalencia es nueve veces mayor en las mujeres que en los hombres. Se estima que la prevalencia puede ser de un caso por cada 10.000 habitantes aproximadamente. Tanto la incidencia como la prevalencia han aumentado tras la modificación de criterios de clasificación de la enfermedad que se realizó en 2013. Revisando la bibliografía, se estiman unos valores de incidencia de 8 a 56 nuevos casos por año y por millón de habitantes. En el estudio de *Ingegnoli et al (3)*, publicado en 2018, revisan tanto la prevalencia e incidencia de las series actuales, tal y como se muestra en la *Figura 1*.

Figura 1. Prevalencia e Incidencia de la esclerosis sistémica. Tomado de Ingegnoli et al (3).

Summary of epidemiological studies of SSc frequency reported since 2010.

First author, year	Country (Area)	Period	Sources of case ascertainment	Case definition	Number of cases ^a	Incidence rate ^b (95% CI)	Prevalence rate ^c (95% CI)
Rosa JE, 2011 [12]	America Argentina (Buenos Aires)	1999–2004	Hospital records	ARA 1980, LeRoy/Medsger 2001	26	21.2 (5.4–37)	238 (220–257)
Furst DE, 2012 [13]	United States of America (across countries)	2003–2008	Private healthcare claims database (population-based)	ICD-9 codes	2739	56	135–184
Gottschalk P, 2014 [14]	Dominican Republic (Caribbean Antilles)	2002–2013	Hospital records	ACR/EULAR 2013	26	–	9.3 (n.r.)
Horimoto AMC, 2017 [15]	Brasil (Campo Grande, Mato Grosso)	2014–2015	Multiple sources	LeRoy/Medsger 2001, ACR/EULAR 2013	89	11.9	105.6
Anagnostopoulos I, 2010 [16]	Europe Greece (Magnesia)	2007–2008	Two-stage population-based survey (random sample)	ARA 1980	1	–	600 (n.r.)
Radić M, 2010 [17]	Croatia (Split-Dalmatia)	2008	Hospital records	ARA 1980	49	–	156 (118–194)
Hoffmann-Vold AM, 2012 [18]	Norway (South-East)	1999–2009	Multiple sources	ARA 1980, LeRoy/Medsger 2001	269	–	99 (88–112)
Bajraktari IH, 2013 [19]	Kosovo (Dukagjini)	2005–2010	Hospital records	ARA 1980	51	28 (n.r.)	146.1 (n.r.)
El Adssi H, 2013 [20]	France (Lorraine)	2006	Multiple sources (CR)	ARA 1980, LeRoy/Medsger 2001	193	–	132.2 (115.8–154)
Lo Monaco A, 2011 [21]	Italy (Ferrara)	1999–2007	Multiple sources	ARA 1980, LeRoy/Medsger 2001	118	43 (30–56)	341 (304–378)
Sipek Dolnicar A, 2013 [22]	Slovenia (Ljubljana)	2007–2009	Hospital records	ARA 1980, LeRoy/Medsger 2001	41	26 (17–35)	–
Andréasson K, 2014 [23]	Sweden (Skåne)	2006–2010	Healthcare register (population-based)	ARA 1980, ACR/EULAR 2013	302	19	305
Meyer A, 2016 [24]	France (Alsace)	2008–2011	Multiple sources (CR)	ARA 1980, LeRoy/Medsger 2001	244	–	228.4 (203.7–253.1)
Kanecki K, 2017 [25]	Poland (nationwide)	2008–2012	National healthcare claims database (population-based)	ICD-10 codes	–	19	94
Kuo FC, 2011 [26]	Asia Taiwan (nationwide)	2002–2007	Health Insurance database (population-based)	ICD-9 codes	1479	10.9	43.1–66.3
Yu KH, 2013 [27]	Taiwan (nationwide)	2000–2008	Health Insurance database (random sample)	ICD-9 codes	118	15 (12–17)	38 (10–53)
Kang GW, 2018 [28]	South Korea (nationwide)	2008–2013	Health Insurance database (population-based)	ICD-10 codes	3974	8	77.7

SSc, systemic sclerosis; ARA, American Rheumatism Association; ACR/EULAR, American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism; CI, confidence interval; CR, capture-recapture method; n.r., not reported; ICD, International Classification of Diseases.

^a Prevalent cases, if both incident and prevalent cases were reported.

^b New cases per million per year.

^c Average or range of total cases per million.

En cuanto a los subtipos de ES, en un estudio realizado en España, con participación de 14 centros, se incluyeron a 916 pacientes, donde el 87,4% eran mujeres y el 12,6% eran varones (4). En cuanto a los datos epidemiológicos, edad media al diagnóstico fue de $51,2 \pm 15,1$ años y la edad media al inicio de la enfermedad fue de $44,9 \pm 15,8$ años. El subtipo más frecuente fue la ESL con un 61,8%, seguido de la ESD con un 26,5%, la ESse y la PreES con un 7,5% y un 4%, respectivamente.

1.3. Fisiopatología de la esclerosis sistémica.

1.3.1 Factores genéticos y ambientales.

Su etiología es aún desconocida, como la mayoría de las enfermedades autoinmunes, se conoce que existe una predisposición genética que, asociada a factores ambientales, podría activar la reacción inmunológica que diera como resultado la enfermedad. Identificar genes causantes o participantes de la enfermedad es muy complicado, dada la heterogeneidad clínica de la enfermedad. Existe un discreto aumento del riesgo de padecer la enfermedad por agregación familiar, además de más riesgo de padecer otras enfermedades autoinmunes. Al inicio de los estudios genéticos, se encontraron varios loci relacionados con los genes del antígeno leucocitario humano (HLA), donde los más importantes son los alelos DRB1, DQA1, DQB1 y DPB1. Tras realizar estudios de asociación del genoma completo (GWAS), se han establecido más de 40 loci en genes, no relacionados con el HLA, que podrían estar implicados, en mayor o menor proporción (5). La mayoría de estos genes codifican proteínas que participan en la respuesta inmunitaria, en la producción de interleuquinas (IL) y la transcripción y reparación del ADN (4).

En un estudio reciente sobre los GWAS (6), que incluyó 26.679 pacientes, se identificaron 27 señales independientes de todo el genoma, incluidos 13 nuevos loci de riesgo, observando algunas específicas asociadas a cada subtipo de ES. Muchos de estas señales afectan a las vías moleculares potencialmente implicadas en la vasculopatía y la fibrosis, dos características principales de la ES. Otras afectan a procesos biológicos como, por ejemplo, DDX6, que codifica una helicasa

de ARN esencial en la regulación del factor de crecimiento endotelial vascular y RAB2A, que es un factor clave en la formación del autofagosoma, por lo que es otro locus de riesgo implicado en la autofagia. Este tipo de estudios, aportan una mejor comprensión de la base genética de la ES.

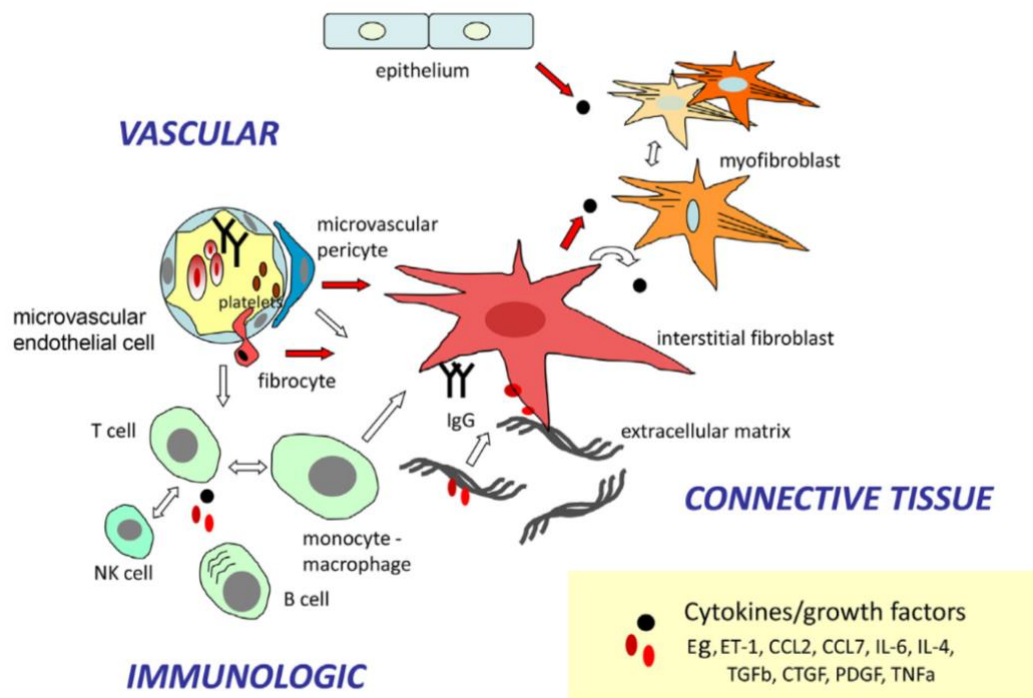
En cuanto a los factores ambientales que influyen en la enfermedad también se han definido múltiples compuestos entre los que destacan la sílice, el aguarrás, tricloroetileno, disolventes aromáticos, disolventes clorados y cetonas, que tienen una clara relación con su exposición reiterada. Con menos evidencia patogénica, se ha encontrado un aumento de los niveles de antimonio, cadmio, plomo, mercurio, molibdeno y zinc (5). Entre los fármacos más frecuente relacionados se encuentran algunos quimioterápicos como los taxanos, y la gemcitabina, el L-triptófano y el gadolinio que podría producir una afectación renal similar a la que existe en la ES (7).

1.3.2 Patogenia.

La etiopatogenia de la enfermedad no está claramente definida. Se postula que, en un paciente con predisposición genética, y con la influencia de algún factor ambiental, se desencadena una reacción inflamatoria autoinmune, con producción de autoanticuerpos y citoquinas que serían el origen biomolecular de las lesiones de los diferentes órganos y por tanto de las manifestaciones clínicas. El daño tisular inducido consiste en una microvasculopatía, y una composición alterada de la matriz extracelular (8). Se produce una alteración funcional del endotelio, donde predomina una vasoconstricción, condicionada probablemente por alteración de la producción del óxido nítrico y la endotelina-1 (ET-1), que además es un

mediador de fibrosis. Existe un aumento de expresión de moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento del tejido conectivo (CTFG) que participan, junto la ET-1, en la migración de células del sistema inmune sobre los tejidos, estimulando a los fibroblastos, que están implicados en la fibrosis tisular (9). Todo esto mediado a su vez, por un estado proinflamatorio vascular con gran cantidad de citocinas implicadas, donde destacan la IL-1, IL-4, IL-6 y ligando de las chemokinas 4 (CXCL4).

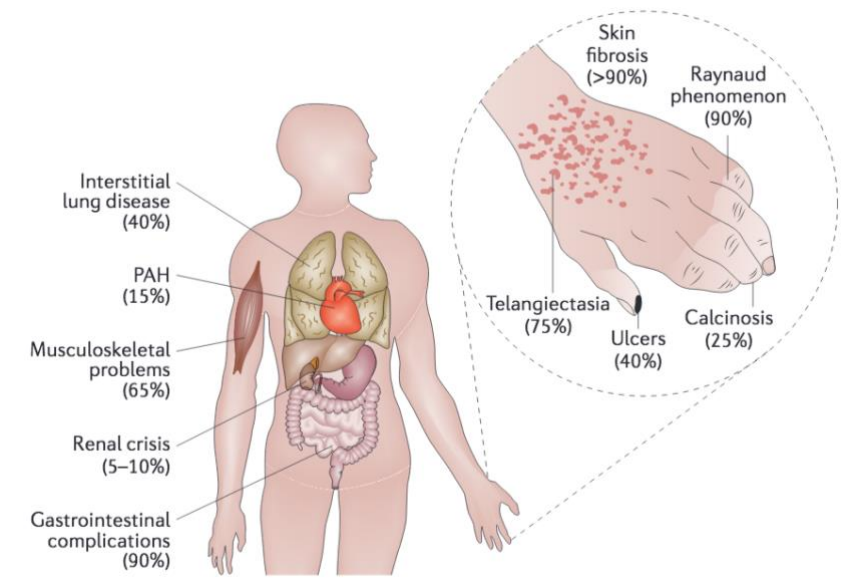
Figura 2. Etiopatogenia de la ES. Tomado de Stern et al (9).



1.4. Manifestaciones clínicas y pruebas diagnósticas de la esclerosis sistémica.

Puesto que la ES es una enfermedad muy variable, que no se comporta de la misma forma en todas las pacientes, los síntomas que produce son muy distintos y dependen de la afectación orgánica de cada individuo. Destaca fundamentalmente la afectación cutánea, pulmonar, digestiva y renal (Figura 3).

Figura 3. Manifestaciones clínicas de la ES. Tomado de Allanore et al (2).



Dado que existen varios subtipos de enfermedad y la sintomatología es muy diversa, se han observado que cada subtipo puede tener una afectación orgánica particular. En un estudio realizado en España (4), se recogieron datos de 916 pacientes, con las diferencias clínicas que se muestran en la *Tabla 1*. Destaca que las pacientes con ESD mostraron frecuencias más altas de fibrosis pulmonar y afectación esofágica y renal. La afectación musculoesquelética, como artritis,

miositis, y afectación tendinosa, fue más frecuente en el subconjunto ESD que en los otros subconjuntos. La afectación cardíaca fue más común en pacientes ESse. En cuanto a las manifestaciones gastrointestinales, el esófago fue el sitio más frecuente de afectación digestiva, presente en el 71,2% de los pacientes con ESD, en el 57,3% de los pacientes con ESL y en el 44,9% de los pacientes con ESse. Con respecto a la afectación pulmonar, la EPI fue más común en pacientes con ESD.

Tabla 1. Manifestaciones clínicas en diferentes subtipos de esclerosis sistémica. Tomado de Simeón-Aznar et al (4).

Table 2 Cumulative Clinical Manifestations Among Patients with SSc Patients According to Their Cutaneous Subsets						
	a	b	c	P Value	P Value	P Value
	lcSSc (%)	dcSSc (%)	ssSSc (%)	a vs b	a vs c	b vs c
Osteomuscular	318 (56.6)	154 (63.4)	36 (52.2)	ns	ns	ns
Arthritis	81 (14.4)	66 (27.2)	9 (13)	<0.0001	ns	0.016
Myositis	25 (4.4)	34 (14)	2 (2.9)	<0.0001	ns	ns
Tendon friction rubs	14 (2.5)	28 (11.5)	1 (1.4)	<0.0001	ns	0.008
Acrosteolysis	46 (8.2)	37 (15.2)	1 (1.4)	0.0004	0.049	0.001
Digestive involvement	392 (69.8)	195 (80.2)	49 (71)	0.002	ns	ns
Esophagus	322 (57.3)	173 (71.2)	31 (44.9)	<0.0001	ns	<0.0001
Gastric	60 (10.7)	41 (16.9)	7 (10.1)	0.02	ns	ns
Malabsortion	9 (1.6)	13 (5.3)	1 (1.4)	0.004	ns	ns
PBC	24 (4.2)	0 (0)	7 (10)	<0.0001	ns	<0.0001
Lung involvement	315 (56)	197 (81.1)	49 (71)	<0.0001	0.02	ns
Dyspnea	169 (30.1)	136 (56)	28 (40.6)	<0.0001	ns	ns
ILD	221 (39.3)	170 (70)	27 (39.1)	<0.0001	ns	<0.0001
FVC ≤70%	70 (12.5)	87 (35.8)	15 (21.7)	<0.0001	ns	0.042
FVC (%) (mean ± SD)	90.7 ± 22.7	74.9 ± 22	83.1 ± 21.7	<0.0001	0.021	0.016
DLCO/VA (%) (mean ± SD)	76.5 ± 23.2	74.8 ± 22.5	70.1 ± 18.3	ns	ns	ns
Ground-glass pattern	62 (11)	77 (31.7)	9 (13)	<0.0001	ns	0.008
Reticular pattern	84 (14.9)	92 (37.9)	10 (14.5)	<0.0001	ns	<0.0001
PAH	91 (16.2)	53 (21.8)	17 (24.6)	ns	ns	ns
Isolated PAH [#]	30 (8.8)	10 (13.7)	3 (7.1)	ns	ns	ns
PAPs (mm Hg) (mean ± SD)	39.6 ± 19.2	40.7 ± 20.8	47.3 ± 23.9	ns	0.03	ns
PAPm (mm Hg) (mean ± SD)	40.9 ± 14.9	34.5 ± 10.9	32.5 ± 13.8	ns	ns	ns
VTR (mean ± SD)	2.7 ± 0.6	2.7 ± 0.8	2.7 ± 0.9	ns	ns	ns
Heart involvement	175(31.1)	79 (32.5)	34 (49.3)	ns	0.004	0.015
Pericarditis	19 (3.4)	19 (7.8)	2 (2.9)	0.010	ns	ns
Ischemia	56 (10)	20 (8.2)	15 (21.7)	ns	0.007	0.004
Conduction alteration	67 (11.9)	25 (10.3)	10 (14.5)	ns	ns	ns
SR	4 (0.7)	19 (7.8)	1 (1.4)	<0.0001	ns	ns
Sicca syndrome	211 (37.5)	80 (32.9)	10 (14.5)	ns	<0.0001	0.003
Capillaroscopy (n = 600)	383 (68.1)	131 (53.9)	54 (78.3)			
Slow pattern	231 (61.6)	50 (38.2)	37 (68.5)	<0.0001	<0.002	<0.0001
Active pattern	114 (30.4)	78 (59.5)	4 (7.4)	<0.0001	<0.002	<0.0001
Death	66 (11.7)	63 (25.9)	6 (8.7)	<0.0001	ns	0.002

lcSSc, limited cutaneous systemic sclerosis; dcSSc, diffuse cutaneous systemic sclerosis; ssSSc, systemic sclerosis sine scleroderma; PBC, primary biliary cirrhosis; ILD, interstitial lung disease; FVC, forced vital capacity; DLCO/VA, diffusing capacity for carbon monoxide corrected by alveolar volume; PAH, pulmonary arterial hypertension; PAPs, systolic pulmonary arterial pressure, measured by echocardiography; PAPm, mean pulmonary arterial pressure, measured by right-sided heart catheterization; VTR, peak velocity of tricuspid regurgitation in meters/s; SCR, scleroderma renal crisis. [#]Results in patients without ILD.

1.4.1 Afectación cutánea.

Las manifestaciones cutáneas son las más frecuentes y las primeras en aparecer. Consisten en un engrosamiento de la piel progresivo que afecta normalmente a manos, pies y cara, y en función del tipo de esclerodermia se extiende de forma diferente. En la fase inicial puede observarse edema y entumecimiento, hasta posteriormente retracción, dureza y aspecto de la piel tenso, que dificulta la movilidad. Es también frecuente la calcificación de tejido celular subcutáneo, denominado calcinosis. Con el tiempo, la esclerosis cutánea tiende a remitir de forma espontánea, produciéndose una regresión de la afectación cutánea y atrofia de la piel.

1.4.2 Afectación visceral.

Manifestaciones vasculares: Hasta en un 94% de las pacientes aparece el fenómeno de Raynaud, que si bien, no es específico de esta enfermedad, es muy característico apareciendo en sus fases más tempranas. Además, pueden aparecer úlceras digitales, a consecuencia de la falta de vascularización, que son dolorosas y conllevan necrosis cutánea, que pueden ser de diferente tamaño, desde pocos milímetros hasta varios centímetros. En casos muy graves pueden llevar a la amputación.

La presencia de telangiectasias, es un hallazgo cutáneo común de los pacientes con ES. Son vénulas y capilares dilatados, de un tamaño aproximado entre 1-20

mm de diámetro, de aparición en rostro, cuello, labios y manos, que predominan en la forma limitada de ES.

Manifestaciones musculoesqueléticas: Una proporción notable de pacientes con esclerosis sistémica desarrolla artropatía o miositis, que pueden contribuir sustancialmente a la disfunción y discapacidad de las extremidades. Es una complicación importante que pasa desapercibida, debido al enfoque en las complicaciones de los órganos internos. Incluyen artralgiyas, poliartritis inflamatoria, lesiones de los tendones, y contracturas de las articulaciones pequeñas y grandes, en ocasiones en relación a la retracción cutánea.

Manifestaciones digestivas: es la afectación orgánica más frecuente y más precoz, ya que tras realizar estudios se han observado en la mayoría de los pacientes, en estadios tempranos de la enfermedad. Puede afectar a todo el tracto digestivo pero la más frecuente sin lugar a dudas, es la afectación esofágica. Lo que se produce a este nivel más frecuentemente es el reflujo gastroesofágico por debilidad progresiva de la musculatura provocando pirosis, dispepsia, regurgitación alimenticia en casos más graves, hasta estenosis y displasias que pueden inducir la aparición de tumores a este nivel. En cuanto a la afectación gástrica es similar a la esofágica pero además es típico la aparición de telangiectasias y lesiones vasculares que facilitan la aparición de hemorragias digestivas (10). A nivel intestinal, tanto en el delgado como en el grueso, se produce una atrofia y debilidad muscular, lo que puede producir síndromes malabsortivos, sobrecrecimiento bacteriano, diverticulosis y estreñimiento crónico en diferentes grados, siendo como complicación más grave la obstrucción y perforación intestinal.

Manifestaciones pulmonares: Las principales patologías pulmonares asociadas son la neumopatía intersticial (EPI) y la hipertensión pulmonar (HTP), ambas constituyen la principal causa de muerte de estas pacientes en las últimas décadas. Su presencia aumenta hasta tres veces el riesgo de muerte. La EPI, suele experimentar progresión dentro de los primeros 4-5 años desde el inicio. Provoca un patrón restrictivo pulmonar con una disminución de la capacidad vital forzada (CVF) y disminución de la difusión de monóxido de carbono (CO). Puede aparecer en ambas formas de la enfermedad, pero es más frecuente en la ESD (11). Se relaciona con sexo masculino, raza afroamericana, la presencia de anticuerpos anti Scl-70, pero no con la presencia de anticentrómero. Su estudio se puede realizar con espirometría, radiografía de tórax y tomografía de alta resolución donde se puede observar vidrio deslustrado y patrón fibrótico. Histológicamente presentan datos de neumopatía intersticial inespecífica (NINE) y, menos frecuentemente, de neumopatía intersticial usual (NIU). La extensión de la fibrosis en la tomografía y la disminución de la capacidad vital forzada, son factores pronósticos.

En cuanto a la hipertensión pulmonar (HP) puede ser a causa de la neumopatía intersticial (clase 3), o una posible afectación del corazón izquierdo (clase 2), o puede ser primaria (clase 1). La HP clase 1, o hipertensión arterial pulmonar (HAP) cursa con disnea y disminución de la difusión de CO, pero sin datos de fibrosis pulmonar. Puede aparecer hasta en un 15% de los casos, y ser rápidamente progresiva. Predomina sobre todo en la ESL y se puede detectar de forma precoz mediante ecocardiografía doppler.

El diagnóstico de la afectación pulmonar y la monitorización de síntomas y función respiratoria es esencial para detectar el momento de iniciar tratamiento de forma precoz.

Manifestaciones cardiacas: probablemente esté subestimada en la actualidad por presentarse en menor frecuencia en estas pacientes. Se ha descrito desde pericarditis a cardiopatía condicionada por fibrosis del miocardio, que puede ser asintomática. También son más frecuentes las alteraciones electrofisiológicas, presentando más incidencia de arritmias y alteraciones de la conducción (12), sin relación con el tipo de esclerodermia que presente el paciente. Se ha demostrado una correlación positiva entre alteraciones electrofisiológicas y alteraciones ecocardiográficas, siendo la disfunción del ventrículo derecho, dilatación de aurícula izquierda, HTP y alteraciones valvulares significativas las más relacionadas.

Manifestaciones renales: la afectación renal más características es la denominada crisis renal, que consiste en el desarrollo de una microangiopatía con daño renal e hipertensión arterial secundaria. Existen factores de riesgo para el desarrollo de la misma como la toma de corticoides, la presencia de anticuerpos anti-ARN polimerasa III, uso de diuréticos, afectación cutánea difusa rápidamente progresiva y anemia, entre otros. Ha disminuido su incidencia en los últimos años, siendo previamente la principal causa de mortalidad.

1.4.3 Trastornos inmunológicos.

Los autoanticuerpos desempeñan una función esencial en la patogenia de la ES, pudiendo detectarse incluso antes del desarrollo de la enfermedad clínica, hasta un 90% de las pacientes presentan algún tipo de autoanticuerpo, existe un 5-9% de pacientes con ES que no presentan autoanticuerpos, lo cual no descarta el diagnóstico. Normalmente están presentes desde el principio de la enfermedad y es raro que cambien durante el curso de la misma (13). Se detectan en suero mediante distintas técnicas (inmunofluorescencia o ELISA [Enzyme-linked Immunosorbent Assay]), destacando:

- **Anticuerpos anticentrómero (ACA):** asociados a la forma limitada de la enfermedad, presente hasta en un 40% de todas las pacientes con ES, hasta en un 70-80% en la ESL y excepcional en la forma difusa. No son específicos de la ES, pudiendo aparecer en otras enfermedades autoinmunes. Se relacionan con la HTP, afectación gastrointestinal y con un desarrollo más lento de la enfermedad.
- **Anti-topoisomerasa I (Scl-70):** son muy específicos de la ES, es raro que coexistan con otros anticuerpos. Presentes hasta en un 55-80% de la ESD y raro en la ESL (<15%). Están asociados a enfermedad pulmonar, mayor daño vascular, crisis renal y fibrosis cardiaca. Las pacientes con ES que presentan de forma simultánea ACA y Anti Scl-70 es inferior a un 1%.
- **Anticuerpos anti-ARN polimerasa III:** menos frecuentes, presentes hasta en un 9% de las pacientes con ES. Relacionados con enfermedad más rápidamente progresiva, mayor gravedad, además de mayor frecuencia de crisis renal y de asociación con neoplasias.

Además de los anteriormente descritos, existen numerosos anticuerpos (Anti-U1 RNP, Anti-U3 RNP, Anti-Th/To...) que se pueden detectar en muy escasa proporción en la ES, y que no sirven como criterios clasificatorios.

1.5. Criterios de clasificación del síndrome de la esclerosis sistémica.

Los criterios de clasificación actuales de la esclerosis sistémica, fueron postulados por la ACR y la European League Against Rheumatism (EULAR) en 2013 (14). Los criterios actuales (*Tabla 2*), incluyeron cambios respecto a los anteriores, descritos en 1980, lo que ha contribuido a un aumento de la sensibilidad y de la especificidad, que actualmente es de un 91% y de un 92% respectivamente.

Tabla 2. Criterios de clasificación de la esclerosis sistémica.

Criterio/Ítem	Sub-ítem	Puntuación
Esclerosis cutánea de los dedos de ambas manos que se extiende sobrepasando las articulaciones metacarpofalángicas.		9
Esclerosis de dedos	Dedos en salchicha	2
	Esclerodactilia	4
Lesiones en las puntas de los dedos	Úlceras digitales (Pitting)	2
	Lesiones en mordedura de rata	3
Telangiectasias		2

Alteraciones capilaroscópicas		2
Hipertensión arterial pulmonar y/o Enfermedad pulmonar intersticial	Hipertensión arterial pulmonar Enfermedad pulmonar intersticial	2 2
Fenómeno de Raynaud		3
Anticuerpos (Anticentrómero, antitopoisomerasa I (Scl-70), antiRNAPolimerasa III.		3

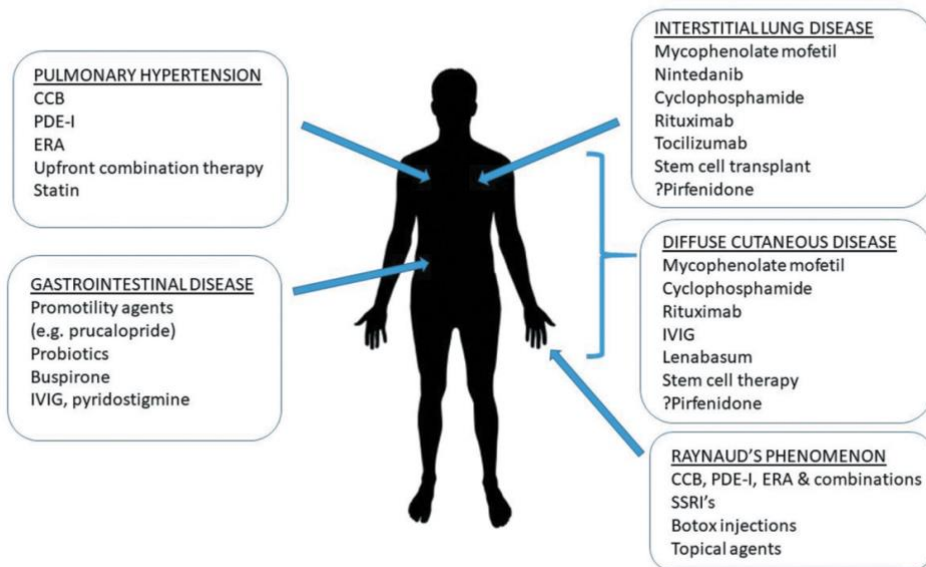
Estos criterios, son criterios de clasificación que sirven para ser aplicados en la inclusión de pacientes participantes en un estudio. De cada criterio, aunque cumpla los dos ítems, se cogerá la puntuación más alta de los dos. La clasificación se consigue con una puntuación igual o mayor a 9 puntos de forma que el primer criterio, la esclerosis cutánea es suficiente para clasificar a una paciente como portador de una ES.

1.6. Tratamiento de la esclerosis sistémica.

Dada la complejidad y la afectación multiorgánica de esta enfermedad, el tratamiento no está estandarizado, es individualizado y el manejo clínico de la enfermedad es heterogéneo. Aunque existen algoritmos terapéuticos, la selección del fármaco dependerá de cada paciente y de la implicación orgánica de su enfermedad. Es fundamental el seguimiento y reevaluación de la situación clínica de forma periódica para valorar inicio de terapias de forma temprana que permitan anticiparnos y modificar el curso de la enfermedad. El tratamiento tiene un enfoque dual, de forma que va dirigido por un lado a las dianas terapéuticas que están implicadas en la activación autoinmune e inflamatoria, y por otro lado

terapias órganoespecíficas para tratar complicaciones o síntomas de la enfermedad (15). Parte de la estrategia de tratamiento se basa en inmunosupresores modificadores del curso de la enfermedad (Figura 4), con capacidad de frenar la cascada inflamatoria, que pueden combinarse incluso de forma sinérgica, sino hay una respuesta de adecuada.

Figura 4. Tratamiento de la esclerosis sistémica. Tomado de Zsuzsanna H. McMahan et al(15).



Afectación cutánea: Son importantes las medidas generales e higiénicas del cuidado de la piel que consisten fundamentalmente en hidratación cutánea y protección frente a bajas temperaturas. Si nos encontramos en la fase inflamatoria se pueden utilizar inmunosupresores. Inicialmente se indicarán glucocorticoides

como la prednisona, durante un mes y posteriormente comenzar con descenso de dosis hasta alcanzar la dosis de mantenimiento con la que obtengamos buena respuesta. Se pueden usar, además, otros inmunosupresores como el metotrexato, micofenolato y ciclofosfamida (16).

El lenabasum, es una nueva molécula que se une de forma selectiva como agonista a los receptores cannabinoides tipo 2, aun con estudios en fase III, parece mejorar de forma significativa la fibrosis cutánea. Pirfenidona y nintedanib no han demostrado utilidad en el tratamiento de la afectación cutánea.

Afectación vascular: Para el fenómeno de Raynaud es fundamental la protección frente al frío y cambios de temperatura, evitar el estrés y el tabaco. En pacientes con Raynaud grave, puede empeorar la vasculopatía distal de las manos y dedos contribuyendo a la aparición de isquemia digital y úlceras. Se trata con fármacos vasodilatadores, como los calcioantagonistas (CA), inhibidores de la fosfodiesterasa (sildenafil, tadalafilo), antagonistas no selectivos de los receptores de endotelina (bosentán). Se puede usar también antiagregantes como el ácido acetil salicílico y vasodilatadores tópicos, como la nitroglicerina en gel o pomada.

Los inhibidores de la fosfodiesterasa, sobre todo tras los últimos estudios realizados con tadalafilo, desempeñan un papel importante en la curación y prevención de las úlceras digitales. El bosentán está específicamente indicado en la prevención de úlceras periféricas y necrosis digital para prevenir la amputación. En caso de que nada de lo anterior sea efectivo, se puede administrar análogos de las prostaciclina, como el alprostadil y el iloprost intravenosos, siendo estos

tratamientos de primera línea para el Raynaud grave y úlceras digitales con escasa respuesta a medicación oral.

Se ha iniciado el estudio del efecto de la toxina botulínica, como agente bloqueante de la liberación de acetilcolina de las terminales nerviosas presinápticas, por el momento efectivo en un subconjunto de pacientes, pendiente de resultados de estudios que definan que pacientes pueden beneficiarse de esta terapia. El riociguat, un estimulador de la guanilato ciclasa soluble, que tiene efectos posteriores estimulantes de la vasodilatación, pero que no ha demostrado mejoría vascular ni reducción de las úlceras vasculares.

Afectación musculoesquelética: La prednisona en dosis bajas puede proporcionar un beneficio sintomático y funcional tanto para la artritis inflamatoria como para la miositis. La prednisona en dosis >15 mg al día generalmente se evita en pacientes con ESD, debido a la preocupación por la precipitación de una crisis renal. El tratamiento con metotrexato semanal se puede utilizar para las complicaciones musculoesqueléticas. Los estudios abiertos de agentes bloqueadores del TNF, abatacept y tocilizumab sugieren que estos agentes pueden ser beneficiosos en algunos casos. La fisioterapia y la terapia ocupacional para mantener la movilidad de los dedos y la función de las extremidades son terapias complementarias importantes.

Afectación pulmonar: es fundamental, una vez diagnosticada un seguimiento exhaustivo para valorar el inicio de tratamiento. Cuando existan parámetros de empeoramiento de la función pulmonar o progresión en pruebas de imagen, lo que se denomina fibrosis progresiva, que sucede aproximadamente en un 15% de

los pacientes, está indicado iniciar tratamiento inmunodepresor. Micofenolato de mofetilo y ciclofosfamida intravenosa, son los fármacos de elección. Tanto el micofenolato como la ciclofosfamida han demostrado mejoría de la función pulmonar y de la calidad de vida a corto plazo, frente a placebo, teniendo el micofenolato una mejor tolerancia por parte de los pacientes (17). La evidencia del uso de rituximab se basa en gran medida, en estudios observacionales, que han demostrado una mejora en la función pulmonar con estabilidad en la CVF. El tocilizumab, es un anticuerpo monoclonal que se une al receptor de la IL-6, ha demostrado en pacientes con diagnóstico incipiente que puede retrasar la progresión de la fibrosis pulmonar, preservando la función pulmonar. Nintedanib, un inhibidor de la tirosín cinasa, que provoca in vitro, una disminución de la migración y la proliferación de los fibroblastos pulmonares, ha demostrado, en un estudio reciente, de 52 semanas de duración, disminución de la pérdida de CVF, con disminución de la fibrosis pulmonar, pero sin resultados en otros órganos. En pacientes seleccionados, en los que exista una falta de respuesta a fármacos o una progresión de la enfermedad pulmonar a pesar del tratamiento inmunosupresor, se puede indicar el trasplante de células madre hematopoyéticas, que ha demostrado misma eficacia que la ciclofosfamida en ensayos aleatorizados. En caso de estar, la situación pulmonar en fase de fibrosis, los fármacos disminuyen su efectividad, en estos casos habrá que plantear fisioterapia respiratoria y trasplante pulmonar.

En cuanto a la HAP, recientemente se estudió la terapia combinada con inhibidores de la fosfodiesterasa y antagonistas de los receptores endoteliales en un grupo de pacientes sin tratamiento previo. Los pacientes fueron tratados durante 36 semanas con tadalafilo y ambrisentán, objetivando a las 36 semanas,

una mejora en las medidas de la función sistólica y diastólica del ventrículo derecho e izquierdo después del tratamiento. La aplicación de la terapia con estatinas es novedosa y actualmente se encuentra en estudio por su efecto cardiovascular. El selexipag, un agonista del receptor de las prostaglandinas, se ha asociado con retraso en la progresión de la HAP, medida por una reducción de morbilidad y mortalidad.

Afectación cardíaca: en pacientes con implicación cardíaca donde existan datos de miocarditis aguda se iniciaría tratamiento corticoideo con prednisona y se añadirá tratamiento inmunosupresor como la ciclofosfamida o el micofenolato, cuya efectividad en los estudios disponibles en la actualidad es superponible. Las pacientes que tengan hipertensión se trataran con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) y CA como fármacos de elección, intentando evitar diuréticos.

Afectación gastrointestinal: El tratamiento se centra actualmente en abordar y mejorar los síntomas del paciente. Los síntomas incluyen la dismotilidad gastrointestinal subyacente y la disbiosis de la microbiota. Se están llevando a cabo estudios con probióticos, que no han demostrado gran mejoría en cuanto a síntomas pero sí menor cantidad de células Th17 en la mucosa intestinal, en comparación con el placebo, lo que puede tener un efecto inmunomodulador. En caso de que presenten clínica de esofagitis y reflujo, está indicado el tratamiento con inhibidores de la bomba de protones y procinéticos.

A pesar de los estudios y de la cantidad de fármacos disponibles, el tratamiento debe decidirse de forma individualizada. No todos los pacientes necesitan

tratamiento, y otros pacientes que presenten progresión clínica de la enfermedad lo necesitarán de forma precoz. La continua investigación de biomarcadores de la enfermedad y dianas terapéuticas, han hecho que el tratamiento pueda ir adaptándose de forma individual a cada paciente y se prevé que continúe habiendo cada vez más fármacos disponibles, que si bien, actualmente no curan la enfermedad, permite disminuir la comorbilidad y la mortalidad de la enfermedad.

1.7. Pronóstico de la esclerosis sistémica.

La esclerosis sistémica se asocia con un aumento de la mortalidad, pero ésta, ha ido mejorando durante las últimas décadas. Está comprobado, desde la década de 1960, que la mortalidad en los pacientes con esclerosis sistémica es más alta, entre 1,05 y 7,2 veces más. Debido a la complejidad y variación de las manifestaciones de la enfermedad, así como a la afectación multisistémica, resulta difícil atribuir las muertes únicamente a la esclerodermia.

En un registro multicéntrico realizado en España (18), donde participaron 879 pacientes con ES, se demostró una alta prevalencia de causas de muerte relacionadas con la enfermedad y se identificó a, la variante ESD, mayor edad al inicio de la enfermedad, la presencia de EPI, HTP y crisis renal como factores pronósticos independientes de mortalidad.

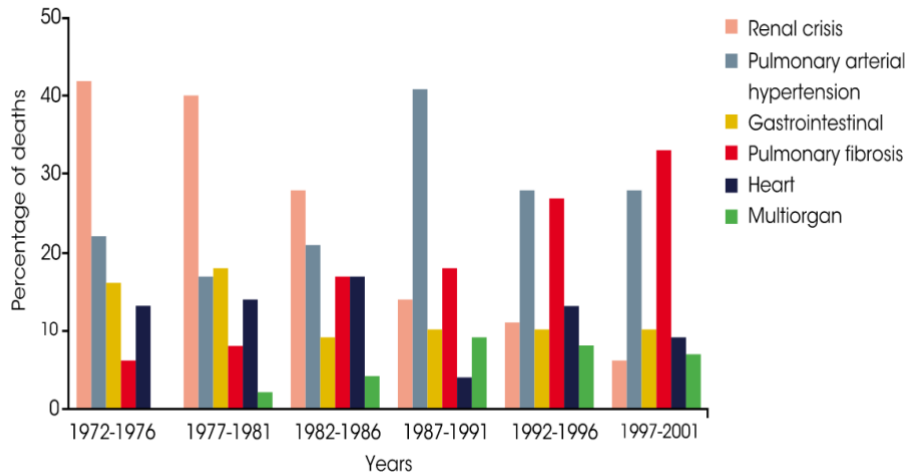
Existen factores de mal pronóstico ya conocidos que implican mayor mortalidad como son: sexo masculino, variante difusa, mayor edad en el momento del diagnóstico y alteración de la función renal (19). Además de estos, están relacionados con una mayor mortalidad los siguientes: raza afroamericana,

afectación visceral pulmonar, renal o cardíaca. En cuanto a parámetros analíticos pronósticos, destacan la anemia, elevación de velocidad de sedimentación globular (VSG) y la proteinuria. La presencia de anticuerpos específicos de ARN polimerasa III parece estar asociada con un mayor riesgo de cánceres, particularmente aquellos que se desarrollan en una etapa temprana de la enfermedad.

1.7.1. Causas de mortalidad en la esclerosis sistémica.

En el pasado, en torno al año 1960, la principal causa de mortalidad en pacientes con ES era la crisis renal relacionada con la propia enfermedad, pero la introducción de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) en la década de 1980 mejoró drásticamente el pronóstico de las complicaciones renales (20). Las causas de muerte en la ES han variado en las últimas décadas tal y como se observa en la Figura 5. En la era actual, la crisis renal es de las causas menos frecuentes, siendo desplazada por la EPI, la HTP y las complicaciones cardiopulmonares como la insuficiencia cardíaca, que representan las principales causas de muerte en la ES (18).

Figura 5. Evolución de causas de mortalidad en la ES. Tomado de Cottin et al (11).



En un estudio reciente (21), la causa más común de muerte relacionada con la enfermedad fue la patología pulmonar con un 55,2%, incluida la HTP (25,3%), la EPI (20,7%) y la HTP combinada con la EPI (9,2%), mientras que otras causas relacionadas con la ES por orden de frecuencia fue afectación miocárdica (14,9%), afectación intestinal (13,8%), crisis renal (13,8%), derrame pericárdico (1,1%) y sepsis por isquemia del dedo o úlcera de decúbito (1,1%).

Los pacientes con ES tienen incrementada tanto la morbilidad como la mortalidad debido a la aparición de una ECV prematura. Se ha demostrado que la prevalencia de enfermedad cardiovascular y macrovascular aumenta en los pacientes con ES en comparación con los individuos sanos y se correlaciona con un peor pronóstico. De hecho, el 20-30% de las muertes en los pacientes con ES son atribuibles a causas cardiovasculares. En particular, un estudio extendido de la base de datos de ensayos e investigaciones sobre esclerodermia (EUSTAR) de la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR) en 2010 mostró que el 55% de las muertes estaban directamente relacionadas con la ES. Curiosamente, el 26% de las

muertes relacionadas con ES se atribuyeron a causas cardíacas, principalmente insuficiencia cardíaca debido a HAP y fibrosis pulmonar y arritmias sin miocardiopatía existente. Sin embargo, entre las muertes no relacionadas con la ES, casi un tercio de las muertes de los pacientes (29%) se relacionaron con eventos cardiovasculares, que se definieron como infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca izquierda no isquémica, accidente cerebrovascular y arritmias (22).

Con respecto a la enfermedad aterosclerótica macrovascular, *Man et al* (23) llevó a cabo un gran estudio de cohorte utilizando una base de datos de atención primaria del Reino Unido de 1986 a 2011. El estudio incluyó a 865 pacientes y demostró que la tasa de incidencia de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular fue de 4,4 y 4,8 por 1000 personas/año en la ES, respectivamente, en comparación con 2,5 y 2,5 en controles. Más recientemente, *Zubieta et al* confirmaron estos hallazgos al demostrar en una cohorte de 1239 pacientes con ES un riesgo significativamente mayor de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (HR 3,49 y 2,35 respectivamente) en una cohorte bien caracterizada de 1239 pacientes con ES en comparación con controles emparejados por edad y sexo (24).

La prevalencia de causas relacionadas con la mortalidad por ES, en España (18), es similar a las identificadas en otros registros y metanálisis previos, de forma que la EPI y HTP fueron la principal causa de muerte. Entre las causas de muerte no relacionadas con la ES, las neoplasias y la afectación cardiovascular, en particular, la insuficiencia cardíaca, fueron las más frecuentemente identificadas. Es complicado diferenciar la afectación cardíaca de la ES, de la no relacionada con la ES en pacientes mayores, por lo que ocasiones, se asume que la miocardiopatía

isquémica estaba relacionada con la ES sólo en ausencia de otros factores de riesgo vascular.

Una cantidad cada vez mayor de evidencia, sugiere que la enfermedad aterosclerótica coronaria y cerebral macrovascular podría tener un impacto crucial, no reconocido y subestimado hasta hace poco tiempo, sobre la morbilidad y la mortalidad cardiovascular. El riesgo cardiovascular aumenta en los pacientes con ES en comparación con la población general; sin embargo, la heterogeneidad de los estudios con respecto a la metodología, la definición de eventos de ECV, el tamaño de las cohortes y los resultados no permite extraer conclusiones definitivas. En definitiva, la ECV y la arteroesclerosis (ATS) están aumentadas en ES, apareciendo de forma precoz, aumentando la morbilidad y suponiendo una causa no despreciable de muerte para estos pacientes.

Dado que la esclerosis sistémica es una enfermedad con amplia cantidad y variabilidad de síntomas, la calidad de vida de los pacientes puede verse gravemente afectada. En general, la salud entendida como el bienestar físico, mental y social, tras ser medida por encuestas y diferentes escalas, se encuentra reducida en la ES, en comparación con los controles de la misma edad y sexo. Las causas de esto en mayor o menor medida son la morbilidad de las complicaciones de la misma, el dolor crónico, la fatiga y los trastornos del sueño.

2. Marco teórico.

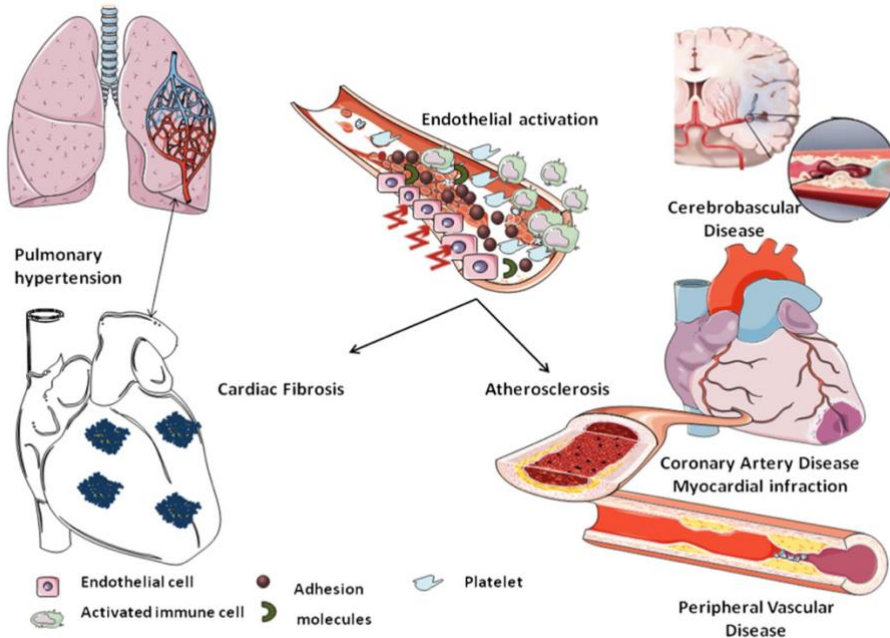
2.1. Riesgo cardiovascular y osteoporosis en pacientes con esclerosis sistémica.

2.1.1. Riesgo vascular y aterosclerosis en la esclerosis sistémica.

Tal y como ocurre en otras enfermedades autoinmunes/inflamatorias, como en la artritis reumatoide (AR) y el lupus eritematoso sistémico (LES), en los últimos años, se ha profundizado en el estudio sobre la mayor prevalencia de arteriosclerosis precoz y enfermedad cardiovascular (ECV) en la ES (25). Una de las causas, es que los factores de riesgo tradicionales son infradiagnosticados e infratratados, aunque esto no es suficiente para explicar las tasas más altas de eventos de ECV y muertes observadas. Estos pacientes tienen complicaciones cardiovasculares más extensas que la población general, que se manifiestan de una forma menos típica, y que se acompañan de una mayor mortalidad tras el primer acontecimiento cardiovascular. Se están desarrollando diferentes herramientas para detectar aterosclerosis subclínica, que han confirmado ser válidas para corroborar la existencia de una aterogénesis acelerada en sujetos con ES.

Está bien documentado, que la etiología de la lesión vascular en las enfermedades inflamatorias sistémicas es multifactorial, donde varios mecanismos distintos, se influyen entre sí, a diferentes niveles, puesto que los factores de RCV clásicos no parecen ser suficientes para explicar este aumento de RCV en la ES. Las interrelaciones entre la inflamación sistémica, la activación autoinmune, los trastornos de la coagulación y los posibles efectos cardiotóxicos de los fármacos (Figura 6) administrados a estas pacientes, constituyen un factor importante que contribuye al exceso de riesgo CV común en todos los trastornos sistémicos (26).

Figura 6. Enfermedad vascular en la ES. Tomado de Psarras et al. (27)



Los vínculos entre los factores de riesgo clásicos de ECV, la carga inflamatoria sistémica y la desregulación autoinmune no se comprenden completamente, pero estas vías parecen ser interdependientes, lo que sugiere que es probable que los beneficios terapéuticos potenciales de atacar la inflamación sistémica reduzcan el riesgo de ECV. Se ha demostrado, que los fármacos modificadores de enfermedades convencionales y biológicos no solo controlan el procedimiento inflamatorio sistémico sino que también ejercen efectos beneficiosos sobre la función vascular (28) y parámetros metabólicos como la resistencia a la insulina. Por otro lado, el tratamiento antiinflamatorio puede presentar efectos perjudiciales sobre el perfil de riesgo de ECV al aumentar la presión arterial, empeorar la insuficiencia cardíaca establecida y aumentar los niveles de lípidos. Todo lo anterior subraya la complejidad de los mecanismos implicados en la mortalidad vascular asociada a enfermedades inflamatorias sistémicas y esboza

posibles áreas de interés e investigación en ES, donde diferentes vías fisiopatológicas como la desregulación del remodelado del tejido conectivo, la fibrosis de órganos internos y la activación de las células endoteliales interfieren con inflamación sistémica que conduce a enfermedades cardíacas y vasculares y una alta mortalidad por ECV.

2.1.2. Manifestaciones cardiovasculares en la esclerosis sistémica.

Inicialmente se pensaba que la afectación vascular implicaba fundamentalmente a la HAP y la crisis renal, pero hoy día se conoce, que la afectación vascular es generalizada. Son varios estudios los que demuestran un aumento de incidencia de ECV en comparación con sujetos sanos, como en el metanálisis publicado por Karen et al (29), en el que se analizaron hasta 33 artículos, se demostró que existe un aumento de aterosclerosis, en los vasos de diferentes territorios, tras comparar con sujetos sanos. Además, se observó, que el contenido de calcio de las arterias coronarias se encuentra aumentado en ES, así como un aumento de la tasa de estenosis carotídea por placas de ateroma. En cuanto a la enfermedad cerebrovascular se observa un aumento de calcificaciones, incluso en pacientes asintomáticos.

Afectación carotídea.

Varios estudios han evaluado la prevalencia de aterosclerosis en arterias carótidas en pacientes con ES mediante ecografía. Es bien sabido que el aumento del grosor de la íntima-media carotídea (GIMC) está asociado con factores de riesgo de ECV convencionales y eventos futuros de ECV como el ictus y la

enfermedad coronaria (25). En el contexto de la ES, algunos estudios demostraron un aumento significativo del GIMC en los pacientes con ES en comparación con los controles (30). La aterosclerosis subclínica se correlacionó en algunos estudios con diferentes parámetros como la edad, el perfil lipídico o los anticuerpos anti-topoisomerasa-I (antiScI-70). En contraposición, muchos otros estudios no lograron demostrar una diferencia en los valores de GIMC entre pacientes y controles con ES (31). Con respecto a la prevalencia de placa aterosclerótica en arterias carótidas, *Ho et al* (32) mostró que el 64% de un total de 52 pacientes con ES tenían enfermedad de la arteria carótida en comparación con sólo el 35% de los controles; no se informaron diferencias significativas en los factores de riesgo cardiovascular tradicionales. Además, *Schiopu et al* (33) mostró que los pacientes con ES tenían una mayor prevalencia de placa carotídea que los controles emparejados y los pacientes con placa tenían niveles aumentados de factores angiogénicos y fibróticos; sin embargo, no se informaron diferencias en el GIMC. En la actualidad, se desconoce si los marcadores morfológicos o estructurales de aterosclerosis acelerada aumentan en pacientes con ES, ya que varios estudios controlados han arrojado resultados no concluyentes. Sin embargo, el pequeño número de pacientes y grupos de control, así como la variación en la evaluación metodológica y ecográfica, subrayan una vez más la necesidad de grandes ensayos clínicos prospectivos con protocolos de evaluación y resultados predefinidos.

Afectación de arterias periféricas

Se han utilizado varias técnicas para evaluar la prevalencia de enfermedad arterial periférica en pacientes con ES: el índice tobillo-brazo (ITB) para las extremidades inferiores, la diferencia de presión arterial entre los brazos para la

enfermedad arterial proximal de las extremidades superiores y velocidad de la onda de pulso (VOP) para la rigidez arterial. Siete estudios evaluaron la función endotelial macrovascular con vasodilatación mediada por el flujo de la arteria braquial, pero los resultados no fueron concluyentes. Algunos de ellos mostraron deterioro de la función vascular en pacientes con ES en comparación con controles sanos (34). Sin embargo, estos hallazgos no se confirmaron en otros estudios. Además, en un pequeño estudio de *Stucker et al* (35), 27 de 29 pacientes con ES tenían una estenosis de las arterias de las extremidades superiores. La gravedad del fenómeno de Raynaud no se correlacionó con la gravedad de los hallazgos angiográficos, pero los anticuerpos anti-Scl-70 fueron más frecuentes entre los pacientes con oclusiones arteriales y estenosis refractarias a fármacos vasodilatadores. Sin embargo, estos pequeños estudios no son suficientes para concluir si la enfermedad macrovascular periférica es más prominente en los pacientes con ES y, lo que es más importante, si contribuye a la mortalidad por ECV en esta afección.

Afectación coronaria

El primer estudio de autopsia para evaluar las arterias coronarias en pacientes con ES se llevó a cabo en 1969, realizado por *D'Angelo et al* (34), compararon 58 pacientes con ES con 58 controles y los resultados sugirieron un aumento significativo de lesiones ateroscleróticas en arterias coronarias pequeñas y arteriolas en pacientes con ES. Sin embargo, no se notificaron diferencias en las arterias coronarias de tamaño mediano.

Sí que se ha observado una correlación entre la presencia de enfermedad coronaria y la HAP, descrito por *Komocsi et al* (36) que observó una fuerte relación entre la HAP y la cardiopatía coronaria mediante el uso de cateterismo cardíaco derecho y angiografía coronaria en 30 pacientes con ES.

Los datos de pacientes con ES sin antecedentes clínicos de enfermedad cardiovascular también mostraron resultados interesantes. Un pequeño estudio en 17 pacientes con ES (37) demostró mediante el cálculo de la puntuación de calcio coronario que la prevalencia de aterosclerosis coronaria subclínica es mayor en la ES en comparación con 17 controles sanos emparejados. *Tarek et al* (38) también realizó un pequeño estudio angiográfico en 14 pacientes con ES asintomáticas (5 limitadas, 9 difusas). El cateterismo coronario mostró un total de 19 alteraciones angiográficas, mientras que tres de cada cinco pacientes con ES limitada presentaron estenosis, pero ninguna del grupo difuso. Aunque ambos estudios incluyeron un pequeño número de pacientes, sus hallazgos sugieren que la aterosclerosis podría afectar las arterias coronarias de forma temprana a los pacientes con ES asintomática.

En resumen, los estudios destinados a evaluar la presencia de aterosclerosis por lesiones coronarias macrovasculares en pacientes con ES han aportado datos contradictorios. El hecho de que la mayoría de estos estudios incluyeran un número reducido de pacientes no permite realizar estimaciones seguras de la prevalencia de enfermedad coronaria en la ES, lo que indica una vez más la necesidad de nuevos estudios bien diseñados.

Cardiopatía en la ES.

La afectación cardíaca primaria en la ES, es difícil de estimar con precisión por múltiples razones: el largo curso asintomático de la enfermedad, la variedad de manifestaciones clínicas, el método de diagnóstico y la definición utilizada para caracterizar la enfermedad. Los estudios de biopsia endomiocárdica han revelado afectación miocárdica en la gran mayoría de los pacientes con ES, mientras que los estudios basados en ecocardiografía mostraron que solo entre el 2% y el 5% de los pacientes con ES tienen una fracción de inyección ventricular izquierda anormal (39). La enfermedad cardíaca puede afectar potencialmente a todas las estructuras del corazón; con más frecuencia, se presenta como hipertrofia miocárdica, arritmias, derrame pericárdico, vasorreactividad coronaria anormal, deterioro valvular e insuficiencia cardíaca (12). Desafortunadamente, cuando el compromiso cardíaco se manifiesta clínicamente, generalmente se asocia con signos avanzados de insuficiencia cardíaca y tiene un pronóstico ominoso.

Independientemente del fenotipo clínico, el sello distintivo de la enfermedad cardíaca en esta población es la fibrosis del tejido cardíaco con depósitos fibróticos irregulares, distribuidos por igual en el miocardio ventricular izquierdo y derecho (40). La vasorreactividad anormal que conduce a la isquemia cardíaca podría desempeñar un papel importante en el inicio y la evolución de la lesión miocárdica a la fibrosis miocárdica. En particular, la isquemia reversible confirmada por anomalías transitorias de la perfusión miocárdica es un patrón único de ES, que no se observa en otras enfermedades autoinmunes (41). A medida que la enfermedad progresa, los pequeños defectos de perfusión pueden culminar en daño tisular irreversible, fibrosis miocárdica y disfunción.

Además de las anomalías funcionales, los defectos estructurales de la microcirculación coronaria pueden contribuir de manera importante a la cardiopatía en la ES; esto lo sugieren las anomalías de la perfusión miocárdica encontradas en pacientes con ES mediante cateterismo cardíaco, ecocardiografía e imágenes con radionucleótidos (42).

Los estudios de resonancia magnética cardíaca también han indicado que la prevalencia de afectación cardíaca clínicamente silenciosa es significativamente alta entre la ES. Los principales patrones de afectación cardíaca revelados mediante resonancia magnética cardíaca son disfunción diastólica, anomalías cinéticas y adelgazamiento del miocardio del ventrículo izquierdo, alteraciones en las fracciones de eyección del ventrículo izquierdo y derecho, así como dilatación del ventrículo derecho relacionado con la presencia de HTP. Los resultados de varios estudios han demostrado que es una técnica sensible para el diagnóstico de afectación cardíaca en la ES incluso en pacientes asintomáticos con evaluación ecocardiográfica normal (43).

2.1.3. Factores de riesgo clásicos de ECV en esclerosis sistémica.

En cuanto a la etiología y los factores que producen dicho aumento de RCV y ATS en la ES, se deduce que estaría relacionado con varios factores: por un lado, factores de RCV tradicionales, y por otro, daño endotelial y factores inflamatorios e inmunológicos derivados de la enfermedad.

La prevalencia de los factores de riesgo de ECV tradicionales en la ES no se ha evaluado en grandes estudios prospectivos. Sin embargo, la cantidad actual de evidencia sugiere que los factores de riesgo de ECV tradicionales no parecen diferir considerablemente en los pacientes con ES (44), en comparación con la población general. *Zakopoulos et al*, examinó 40 pacientes con ES y 45 controles, pero no demostró diferencias en la presión arterial en la monitorización ambulatoria de la presión arterial durante 24 horas entre los dos grupos (45). Sin embargo, otro estudio que examinó 48 pacientes con ES y 46 controles sanos demostró un ligero aumento de la presión arterial y la glucosa en ayunas, así como un índice de masa corporal más bajo en los pacientes con ES (46). Existen algunos estudios que indican que pueda haber un aumento de resistencia a la insulina e incremento en la presión arterial, pero la mayoría indican lo contrario, sugiriendo que otros factores pueden contribuir al aumento de la prevalencia de enfermedad CV en la ES, pero en la mayoría de los estudios se ha observado que, en la ES, no existe un aumento de los factores de riesgo cardiovascular habituales comparado con los controles, por lo que se están buscando otros factores y causas.

Los resultados de los estudios sobre lípidos son contradictorios. De hecho, *Lippi et al* (47), reportaron altos niveles de lipoproteína A, que generalmente se asocian con un mayor riesgo CV, mientras que *Borba et al* (48) representaron niveles más bajos de lipoproteínas de alta densidad y colesterol total en pacientes con ES con respecto a los controles. Además, los pacientes con ES pueden tener niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como de homocisteína y PCR, todos asociados con un mayor riesgo de aterosclerosis.

Aunque los mecanismos no están del todo dilucidados se han relacionado con el daño endotelial, secundario a inflamación crónica, así como alteración del perfil lipídico. Como biomarcadores de arterioesclerosis estarían aumentados los niveles de homocisteína, PCR y colesterol LDL.

En un estudio donde se comparó a 40 pacientes con ES y controles sanos (49), se volvió a objetivar una aterosclerosis prematura, observándose un aumento de grosor intima media carotídea asociada a la edad, niveles de proteína C reactiva (PCR), colesterol, colesterol LDL y triglicéridos. En cuanto a la dilatación mediada por flujo, únicamente se relacionó con la toma de corticoides. Sin embargo, otros estudios no coinciden a este respecto y no han encontrado correlaciones significativas.

El resultado más interesante del presente estudio (50) es que no se observaron diferencias significativas en la ocurrencia de eventos CV entre pacientes con ES y pacientes con AR, a pesar de que la prevalencia de dislipemia y diabetes mellitus, dos importantes factores de riesgo para el desarrollo de ECV, fue casi el doble en AR en comparación con ES. Estudios previos en pacientes con ES han demostrado una mayor carga de ECV en comparación con la población general (23) a pesar de una prevalencia similar o incluso menor (44) de los factores de riesgo CV tradicionales.

2.1.4. Factores de riesgo cardiovascular relacionados con la esclerosis sistémica.

Está bien documentado que la etiología de la lesión vascular en las enfermedades inflamatorias sistémicas es multifactorial, donde varios

mecanismos distintos, se afectan entre sí, a varios niveles. Las interrelaciones entre la inflamación sistémica, la activación autoinmune, los trastornos de la coagulación y los posibles efectos cardiotóxicos de los medicamentos antirreumáticos constituyen un factor importante que contribuye al exceso de riesgo CV común en todos los trastornos sistémicos (51).

Uno de los mecanismos fundamentales, puede estar relacionado con la propia vasculopatía que caracteriza a la ES, ya que la fibrosis que aparece tanto en piel como en los diferentes órganos y la inflamación sistémica, estaría ocasionada tanto por los autoanticuerpos como por el conjunto de citoquinas proinflamatorias que se encuentran aumentadas. La presencia del fenómeno de Raynaud y el daño microvascular, que ocasionan incluso necrosis y úlceras digitales, presentan características similares a las que pueden aparecer en arterioesclerosis. Dado la fibrosis del tejido conectivo y los vasos sanguíneos el riesgo de padecer esta enfermedad esta aumentado considerablemente y por lo tanto el riesgo de enfermedad cardiovascular.

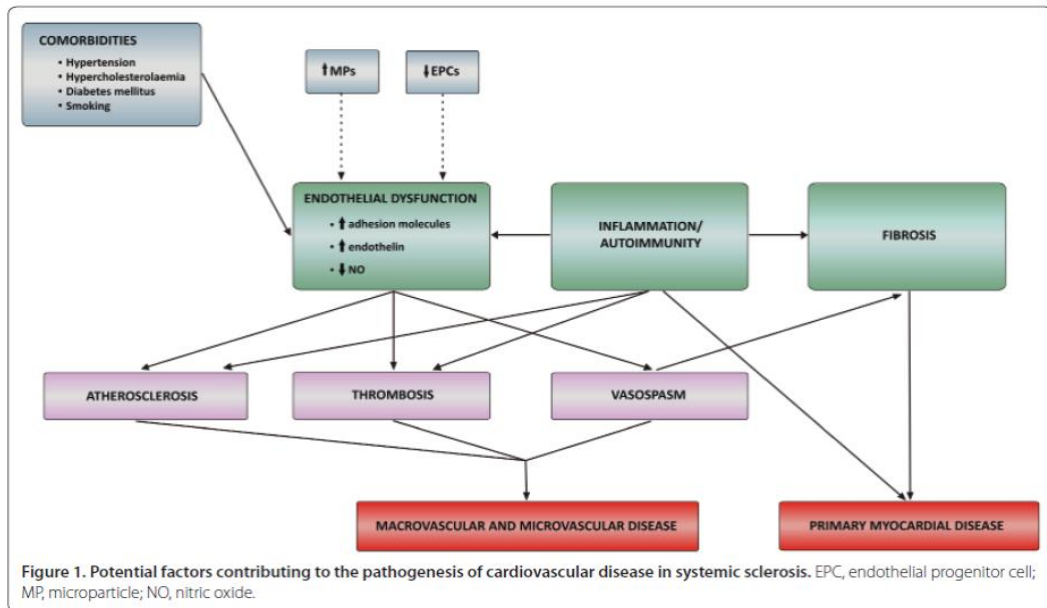
La ECV en la ES es compleja y multifactorial y, a excepción de la aterosclerosis y la inflamación crónica, otros mecanismos específicos de la enfermedad, como la microangiopatía y el vasoespasmo, pueden ser clave en el desarrollo de ECV en pacientes con ES. La microvasculopatía está bien documentada en la ES y, aunque todavía no se ha dilucidado claramente a través de qué mecanismos actuaría, parece contribuir al desarrollo de enfermedad macrovascular, probablemente sea a través de procesos patológicos como disfunción endotelial, activación de células endoteliales y remodelación vascular deteriorada. Esta hipótesis está respaldada por los informes de algunos estudios de que la crisis renal (52) y la HAP (53) , las

dos principales características clínicas de la microvasculopatía, son predictores independientes de ECV. Además, el hecho de que la HAP sea en general más prevalente en la ES en comparación con la AR (54) puede reflejar una mayor carga de disfunción endotelial en pacientes con ES, lo que refuerza la hipótesis antes mencionada y explica potencialmente el riesgo CV similar en las dos enfermedades a pesar de la menor prevalencia de otros factores de riesgo de ECV comunes en pacientes con ES. En un estudio (55), encontramos una estrecha relación entre alteraciones en la capilaroscopia grado 2 y la ocurrencia de eventos CV, fortaleciendo el valor clínico potencial de la capilaroscopia, en la estratificación del riesgo CV de pacientes con ES. Estos resultados sugieren que el estado microvascular local (dedo), probablemente representa un deterioro microvascular global que alcanza la circulación arterial periférica (úlceras de miembros arteriales periféricos), la microcirculación coronaria (aumento de la presión de llenado del VI estimada con el ejercicio) y la circulación pulmonar (HTP precapilar).

Dentro de la etiología de esta microangiopatía, se han realizado varios estudios que implican a la célula endotelial como responsable del daño vascular. Previamente a la arterioesclerosis establecida, existe una disfunción endotelial como consecuencia de un desequilibrio entre vasodilatadores y vasoconstrictores. La respuesta del sistema inmune mantenida y un defecto en las células madre endoteliales serían las causas principales que perpetúan esta situación que afecta a todas las funciones del endotelio (56): coagulación, fibrinólisis, modificación del calibre vascular, etc. Esta disfunción puede implicar mantenimiento de hipoxia y desestructuración del endotelio, lo cual modificaría la proporción de los factores que influyen sobre éste, como el factor de crecimiento vascular del endotelio

(VEFG) que, ya por si solo, aumentaría la fibrosis , tal y como se muestra en el esquema (Figura 6) de *Ngian et al* (44).

Figura 6. Patogénesis de enfermedad cardiovascular en ES. *Ngian et al* (44)



Se ha demostrado que los niveles circulantes de pentraxinas y factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), están elevados comparado con sujetos sanos. En concreto, el nivel de pentraxinas está elevado en pacientes con ES que tienen úlceras digitales o HAP, mientras que el nivel de FGF-2 es más bajo en pacientes con ES con HTP (57). Los niveles de quimiocina CXCL4 se correlacionan con la fibrosis cutánea y pulmonar y también con la HAP. Todos estos factores internos producen en los pacientes con ES, un envejecimiento prematuro, consistente en aparición de ECV y enfermedad renal crónica (ERC) como

consecuencia de dicha fibrosis y alteraciones en el metabolismo fosfocálcico, presentando calcificación de tejidos y arterioesclerosis.

Con respecto a las características de la enfermedad (58), se ha observado que la duración de la enfermedad, la positividad de anticuerpos anticentrómero, la dosis acumulada de glucocorticoides y la puntuación elevada en la escala de Rodnan modificada, se asocian con ECV y / o aterosclerosis en la ES.

2.2. Osteoporosis en esclerosis sistémica.

Existen numerosas enfermedades, cuya etiopatogenia perpetúa un estado proinflamatorio, como en las enfermedades autoinmunes, en la que se conoce existe una disminución de la masa ósea de dichos pacientes. En un reciente metanálisis (59), se observó que las pacientes con ES tiene una reducción significativa de la masa ósea y más riesgo de fractura vertebral. En otra revisión de *Omair et al* (60), donde se comparan 19 estudios de los últimos años se concluyó que la osteoporosis y las fracturas están aumentadas en pacientes con ES, frente a controles sanos, especialmente cuando hay factores de riesgo clásicos de osteoporosis presentes. Se ha visto también incrementada en hombres con ES, siendo además más grave, aun presentando los mismos factores de riesgo tradicionales que los controles sanos.

Además de los factores clásicos implicados en una osteoporosis precoz, como la menopausia, consumo de tabaco, sedentarismo..., en la ES existe un ambiente inflamatorio que promueve la remodelación ósea en exceso, de forma que, existe afectación del hueso y su densidad. Otros factores que influirían en estas pacientes

serían el déficit de absorción de nutrientes, índice de masa corporal bajo, disminución de la síntesis de vitamina D por la fibrosis cutánea e inmovilización debido a contracturas por flexión de las articulaciones y atrofia muscular. Sin bien es cierto que presuponemos que estos factores influyen, dada la etiología multifactorial de la osteoporosis, es difícil establecer una correlación. En un estudio realizado en España, por *Rios et al* (61) se han observado datos de alta de prevalencia de osteoporosis y osteopenia en pacientes con esclerosis sistémica. También se detectó una disminución de los niveles de vitamina D con niveles por debajo de la media de población, sin llegar a establecer una relación causal ni con la osteopenia ni con la osteoporosis.

En el análisis de marcadores óseos e inflamatorios relacionados con la osteoporosis *Dovio et al* (62), no encontraron diferencias significativas, al comparar con sujetos sanos, entre las mediciones de osteocalcina, péptido del colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, pero sí en el caso de la vitamina D, la cual se encuentra disminuida y se correlaciona con un nivel bajo del péptido del colágeno tipo I. Se observó, un aumento de los niveles de sRANKL y del cociente sRANKL/osteoprotegerina en pacientes con ES, como consecuencia de un posible sustrato biomolecular óseo alterado. En otro estudio, se ha observado una relación significativa entre la presencia de úlceras digitales y presencia de AAC, con alteraciones en la estructura ósea medida por tomografía (63).

En cuanto a los niveles de vitamina D en pacientes con ES, cuando se realiza una comparación entre las pacientes con ES sin suplementación con vitamina D y pacientes en tratamiento con vitamina D, se observa una deficiencia de la misma hasta en un 97% de las pacientes que no eran suplementadas, siendo hasta el 44%

de estas un déficit grave. Destaca, además, que a pesar de la suplementación únicamente un 30% de las pacientes llegaron a niveles normales (64). Algo similar se observó en otra serie de pacientes españolas donde se encontró deficiencia de vitamina D en el 81% de los pacientes, a pesar de que el 60,4% estaban recibiendo suplementos (65). En este estudio no se objetivó correlación entre toma crónica de corticoides con mayor presencia de osteopenia/osteoporosis.

2.2. FGF-23 y Klotho.

2.2.1. FGF-23 y Klotho.

En el año 2000 se describe por primera vez una mutación en el estudio de la hipofosfatemia autosómica dominante, que implica la aparición de una nueva molécula no conocida hasta entonces. El *fibroblast growth factor 23* (FGF-23) es una hormona peptídica sintetizada en el hueso, por los osteoblastos y osteocitos. Se conoce que desempeña varias funciones, entre las que se encuentran principalmente:

- La eliminación de fósforo de forma directa, a través del riñón inhibiendo el cotransportador de sodio-fósforo Npt2a (66).

- Por otro lado, de forma indirecta, influye en la transformación de la vitamina D a nivel renal favoreciendo una retroalimentación negativa, y aumentando la síntesis de CYP24A1 24-hidroxilasa, la principal enzima que se encarga de la degradación de 1,25(OH₂) D₃ (67) . Además, disminuye la transcripción del gen CYP27B1 que codifica la alfa-1-hidroxilasa, que transforma la vitamina D₂ (25-hidroxicolecalciferol) en vitamina D₃ (1,25(OH₂) D₃) (1,25 dihidroxicolecalciferol o calcitriol), que es su metabolito activo y cuya función consiste principalmente en

la mineralización ósea a través de un aumento de la absorción de calcio en la luz intestinal y reabsorción a nivel renal.

- Además, FGF-23 disminuye la transcripción de mRNA de la parathormona (PTH) y su secreción de forma dosis dependiente. Por lo tanto, a más cantidad de FGF-23 circulante, menos secreción de PTH, que también regula la calcemia y cuya función consiste en la estimulación de los osteoclastos para aumentar la resorción ósea y de esta forma elevar el calcio en la sangre. En el parénquima renal, la PTH aumenta la excreción de fósforo y, a su vez, la PTH puede estimular la síntesis de FGF-23 (68).

Los receptores implicados son diferentes, según las diferentes funciones antes descritas:

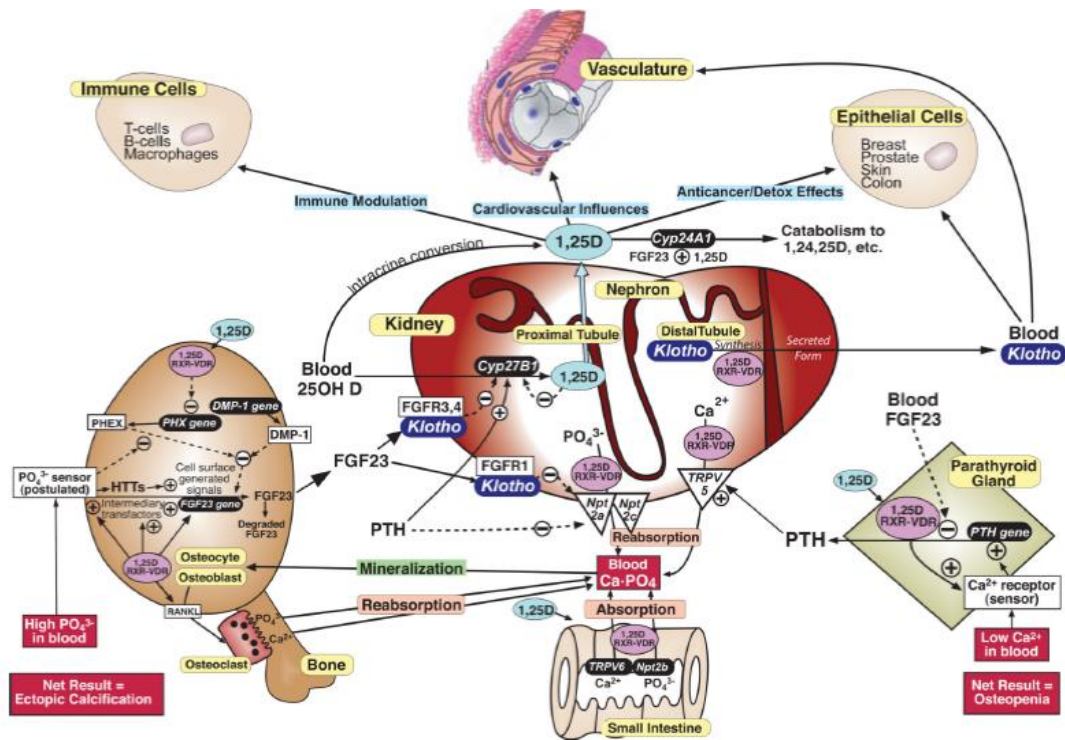
- FGFR1: actúa a nivel de los túbulos renales.
- FGFR3 y FGFR4: disminuye la expresión de CYP27B1 e induce CYP24A1.

En ratones, el déficit de FGF-23 se acompaña de hiperfosfatemia y un incremento de vitamina D, de manera que aumentan la calcificación de los tejidos condicionando enfermedades tan importantes como la arterioesclerosis, osteoporosis, pérdida de audición, atrofia cutánea y muscular y sus consecuencias, como el envejecimiento prematuro.

En contrapartida, el exceso de FGF-23 produciría fundamentalmente tres enfermedades diferentes: raquitismo hipofosfatémico, osteomalacia (fundamentalmente en el caso de tumores secretores de FGF-23) y raquitismo autosómico dominante.

En la Figura 7, *Haussler et al (66)* plasma la visión actual del eje endocrinológico que estamos estudiando, que está condicionando una nueva forma de entender la regulación del fósforo y el calcio en la sangre, a raíz del descubrimiento de FGF-23 y Klotho.

Figura 7. Regulación de FGF-23 y Klotho. Extraído de Haussler et al. Rev Endocr Metab Disord. 2012; 13(1): 57–69



En cuanto a la regulación de la síntesis de FGF-23 se sabe por experimentos llevados a cabo en ratones que la 1,25(OH)₂D₃ induce la producción de FGF-23 al unirse a su receptor VDR, el cual activaría su transcripción, aunque la detección de aumento de FGF-23 en un intervalo muy corto de tiempo sugiere que, además, debe haber otro tipo de mecanismos paracrinos que actúen sobre los osteoclastos

e inicien la síntesis del mismo. La secreción de FGF-23 está regulada por la vitamina D en los osteocitos, y la hiperfosfatemia sería otro estímulo por el cual estas células, aumentarían la secreción de FGF-23, independientemente de la vitamina D. De esta forma el hueso, en comunicación con el riñón, es capaz de regular también los niveles de fosfato en sangre, evitando la hiperfosfatemia (69) y exceso de vitamina D o colecalfierol. La leptina también induciría la síntesis de FGF-23 de manera que existen tres estímulos principales para su síntesis por el osteocito: el fosfato, la 1,25(OH₂) D₃ y la leptina.

El FGF-23 tiene un papel crucial en la regulación del metabolismo fosfocálcico. En pacientes con enfermedad renal crónica, los niveles de FGF-23 están elevados para compensar la hiperfosfatemia, a la vez que los niveles de Klotho están disminuidos.

Klotho es una proteína que funciona, en parte, como cofactor obligatorio de FGF-23, uniéndose a los receptores de esta molécula y permitiendo que FGF-23 ejerza su función (70). De esta manera un déficit de Klotho tendría las mismas consecuencias que un déficit de FGF-23. Klotho se expresa en el riñón, tanto en el túbulo distal como el proximal. En su forma soluble, Klotho, es secretada a la sangre y ejerce su función en diferentes órganos del cuerpo de forma independiente a FGF-23 (71). Se trata de una sialidasa que tiene actividad sobre los ácidos siálicos de las glucoproteínas de superficie, y su actuación previene la endocitosis de canales iónicos de manera que permanecen sobre la superficie celular. Se ha demostrado su acción en ratones *knock-out* FGF-23, gracias a su actividad sobre los glúcidos de los receptores, su forma de acción directa es

independiente de FGF-23, así como la expresión de Klotho de forma endógena en los vasos sanguíneos tanto en ratones como en humanos.

2.2.2. FGF-23 y Klotho y riesgo cardiovascular.

De acuerdo con todo lo señalado anteriormente, actualmente se afirma que tanto FGF-23 como Klotho pueden contribuir a la calcificación intravascular sistémica y de tejidos blandos. Actualmente está en auge el estudio de la relación entre las dos moléculas y la enfermedad cardiovascular tanto en pacientes con enfermedad renal como pacientes con cardiopatías. El tratamiento de la hipercalcemia, hiperfosfatemia e hipovitaminosis D, ha sido clave en mejorar la morbimortalidad de la disfunción cardíaca en pacientes con ERC y metabolismo fosfocálcico alterado.

Además de lo antes citado se ha demostrado una asociación entre FGF-23 e hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) de forma directa. Ya se había visto previamente el aumento de FGF-23 en pacientes con enfermedad renal crónica (72), como respuesta a la hiperfosfatemia de estos pacientes, que además asociaban HVI. Sin embargo, el estudio de *Shibata et al*, se comprueba que es la propia molécula, la que induce la hipertrofia, y como consecuencia de la hipertrofia, disminuye la fracción de eyección (73). En este caso, su acción sería independiente de Klotho que, como ya se ha descrito anteriormente, solo actúa como correceptor en el riñón y las glándulas paratiroides (68), y demostrado con un modelo de ratón deficiente en Klotho en el que la producción de FGF-23 produce el mismo efecto sobre el corazón que en los no deficientes. Esta asociación entre FGF-23 y HVI es independiente de otros factores que inducen HVI

como el sexo, la raza, HTA, DM, cardiopatía previa, el estadio de enfermedad renal, el tratamiento antihipertensivo e incluso los niveles de vitamina D, lo que nos hace creer que la asociación entre ambos es importante. Con modelos en ratón se estudió también la vía por la cual se produce la hipertrofia, con la hipótesis de un efecto directo sobre los miocardiocitos. Consistiría en un aumento de proteínas del sarcómero a través de una vía de señalización de los receptores de FGF. En el estudio realizado por *Touchberry et al* (74) encontraron un aumento significativo del miocardiocito in vitro al exponerlo a FGF-23, y se ha relacionado con marcadores de hipertrofia cardiaca y un aumento de la proteína total del músculo asociado en concreto a los receptores FGFR1 y FGFR3, cuya expresión estaba aumentada. Se observó también, que la expresión de Klotho estaba disminuida. De esta manera la HVI está relacionada de forma independiente al resto de FRCV y a Klotho pero condicionada por la unión a los receptores de FGF.

Al llevarlo a la práctica con animales se confirmaron los resultados in vivo. Se observó un aumento del calcio intracelular, lo que condujo a un aumento de la contractilidad muscular, incluso con una disminución de la fracción de eyección del 11% comparado con los ratones *wild type*. Por todo lo expuesto, en la actualidad ya hay varios estudios que concluyen que FGF-23 se puede utilizar como factor predictor de ECV, de manera que se asocia con ECV subclínica y mayores eventos de fallo cardiaco agudo y cardiopatía isquémica (75)(76).

En cuanto a Klotho, ha sido descrito un papel renoprotector y vasculoprotector de esta molécula, por lo que se la ha denominado, la molécula antienvjecimiento (77), ya que, en ratones deficientes de Klotho, se produce un fenotipo de

envejecimiento prematuro, caracterizado por arteroesclerosis, calcificación ectópica, disminución de la masa mineral ósea y atrofia cutánea.

Tanto la acción de FGF-23 como la de Klotho sobre el endotelio, aún es algo controvertida y se está estudiando en profundidad. Aunque sabemos que el efecto de Klotho sobre el endotelio es beneficioso, el incremento de FGF-23 está asociado con un incremento de la enfermedad vascular (78), y no está del todo claro cómo interactúan ambos en el endotelio. Se ha comprobado su función sobre los vasos sanguíneos en un estudio que incluía tres modelos vasculares diferentes (79): aorta de ratón, vena umbilical humana y células musculares lisas humanas. La exposición del endotelio a FGF-23 produce vasoconstricción, de forma dosis dependiente, independiente de la acción de Klotho. Los principales efectos de Klotho son revertir la vasoconstricción, aumentando la producción de óxido nítrico y en el contexto de un aumento de fosfato. FGF-23 tiene un efecto vasoconstrictor mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS), produciendo daño endotelial, que depende de los niveles fosforo en sangre, de manera que a más fosforo, se producirían más cantidad de ROS. Este efecto puede ser contrarrestado por la presencia de Klotho.

En otros modelos se ha estudiado la influencia de estas moléculas sobre la calcificación arterial y se ha demostrado que factores inflamatorios o de estrés crónicos, como el TNF- α , pueden influir negativamente sobre los vasos sanguíneos, lo que podría ayudar a entender la relación entre el envejecimiento prematuro y la inflamación mantenida (80).

Lim et al (81) confirmaron por primera vez, la presencia de Klotho en el endotelio y estudiaron su función en esta localización. La deficiencia de Klotho potencia el desarrollo de calcificación en los vasos sanguíneos. Este grupo de investigadores comprobaron que el FGF-23 actuaría a través de los receptores y activaría las cascadas de p-ERK y p-AKT, induciendo proliferación vascular y calcificación de la matriz extracelular. Cuando se añade Klotho sobre estos modelos in vitro, se inhiben ambos procesos, por lo que se piensa que la actividad de FGF-23 en el endotelio es dependiente de Klotho. Como conclusión Klotho tendría un papel bifuncional: uno a nivel vascular local, como un inhibidor endógeno de la calcificación vascular y, segundo, como un cofactor requerido para la señalización vascular de FGF-23.

La vitamina D también tendría influencia sobre los vasos sanguíneos, aunque no se conocen del todo los mecanismos. Hoy en día, se sabe que dosis terapéuticas de vitamina D pueden corregir el hiperparatiroidismo secundario, y la activación de los receptores de la vitamina D (RVD), pueden tener un efecto protector sobre los vasos (82). En el estudio de *Lim et al* (81), la activación de RVD en microambientes con hipercalcemia puede restaurar los niveles de Klotho. Esto se producía incluso con administración de calcidiol de forma que nos lleva a pensar que pueda existir la enzima 1,25 hidroxilasa (CYP27B1) en los vasos, y que la regulación de estas moléculas se realice en el propio endotelio de forma paracrina.

Estos mecanismos de regulación explican que exista una mayor calcificación arterial en la ERC. La uremia produciría un déficit de Klotho de manera que habría una resistencia periférica a FGF-23, que no actuaría en los vasos con su correceptor, y aumentaría la calcificación (78). En este caso el aporte de vitamina

D en estos pacientes sería beneficioso, porque aumentaría los niveles de Klotho y se restauraría la función de FGF-23.

En el caso de pacientes con DM tipo 1 y 2, tanto los que presentan afección macrovascular como los no, los niveles de Klotho no se encuentran alterados a no ser que presenten nefropatía asociada. Esto puede indicar que Klotho no participaría en la ECV asociada a la DM, pero si se vería alterado ante presencia de ERC (83).

2.2.3. FGF-23 y Klotho y osteoporosis.

La mineralización ósea es un proceso activo y continuo en el que participan varias hormonas. En las últimas décadas a este proceso se han añadido tanto FGF-23 como Klotho, haciendo más complejo el mecanismo de formación y destrucción ósea y, por tanto, la regulación del fosforo y el calcio. Son conocidas alteraciones en la expresión de FGF-23 y sus consecuencias, relacionadas con una pérdida de masa ósea. Hasta ahora, no hay muchos estudios que relacionen estas moléculas con la osteoporosis, pero sí se ha comenzado a estudiar el papel que tienen ambas sobre el tejido óseo.

En modelos realizados sobre tejido óseo se ha comprobado que FGF-23 tiene efecto directo sobre los osteoclastos, inhibiendo su diferenciación en estadios tempranos y modula su actividad activándolos ligeramente (84). Este efecto es independiente del resto de hormonas reguladoras. La vitamina D funciona en el mismo sentido, de manera que también inhibe la actividad y la diferenciación de los osteoclastos. Ambas moléculas tienen funciones contrapuestas en el riñón

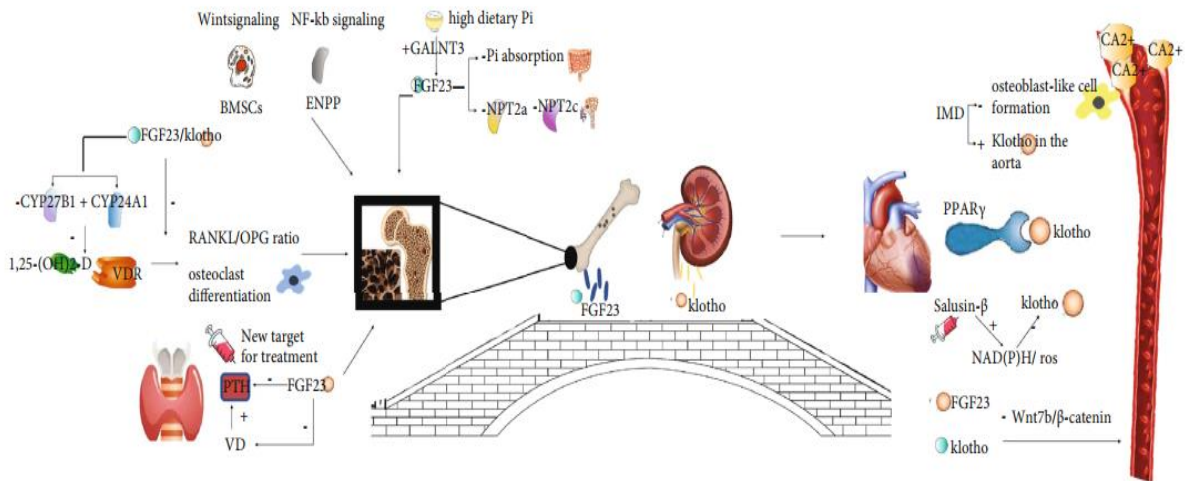
(FGF-23 inhibe la reabsorción de fosfato y vitamina D la favorece) pero en la glándula paratiroides tiene el mismo efecto inhibiendo la producción de PTH.

En otro estudio se ha comprobado que FGF-23 no tiene efecto sobre la célula osteoprogenitoria (85), pero es capaz de suprimir la diferenciación de los osteoblastos, así como impedir la calcificación de la matriz ósea. En este caso una sobreexpresión de FGF-23 regularía de forma negativa la formación de hueso, a través de la estimulación del receptor FGFR1, de forma autocrina y paracrina.

En cuanto a las manifestaciones clínicas en este caso sólo hay un estudio que relaciona las fracturas con los niveles de FGF-23 (86), de forma que no se ha encontrado ninguna relación clara entre ambos. No está dilucidado aún si habría más fracturas en pacientes con ERC y por consiguiente con mayores niveles de FGF-23.

Uno de los mecanismos por los cuales el eje Klotho/FGF-23, podría influir en la presencia de osteoporosis y la calcificación vascular es la vía de la Wnt/ β -catenina (87). Los estudios actuales son contradictorios, por un lado, se afirma que tanto Klotho como FGF-23 tienen efectos opuestos en la calcificación vascular inducida por el alto contenido de fosfato, mientras que, por otro, se ha observado que Klotho y FGF-23 afectan a la calcificación vascular inducida por fosfato al inhibir la vía Wnt7b/ β -catenina, que es capaz de prevenir la calcificación vascular. El mecanismo común por el cual el eje FGF-23/Klotho afectaría la OP y la VC se muestra en la *Figura 8*.

Figura 8. Eje FGF-23/Klotho, osteoporosis y calcificación vascular. Extraído de *Wei et al (87)*.



2.2.4. FGF-23 y Klotho en ES.

En la actualidad hay varios artículos publicados donde se ha comenzado a estudiar estas moléculas en la ES. Respecto a FGF-23 no existe ningún artículo donde encuentren claras diferencias. Sin embargo, con Klotho hay varios grupos de investigación que sí las han encontrado. En el artículo publicado por *Talotta et al (88)*, comparan los resultados de las mediciones en sangre de ambas moléculas en 81 pacientes, frente a 136 controles. Se observó que, en las pacientes, los niveles de Klotho no tienen una relación directa ni con el sexo ni con la edad. Para encontrar diferencias en comparación con los controles, fue necesario aparear por edad, de forma que se observa un déficit de Klotho en los pacientes, frente a los controles. No hallaron correlaciones entre las variables clínicas y analíticas con los niveles de Klotho y sí con la presencia de anticuerpos antipéptido citrulinado, que se acompañan de niveles más bajos.

En otro artículo, publicado por *Ahmadi et al (89)*, en el que se analizaron 60 pacientes (30 con ESL, y otras con ESD) y 30 controles, se encontraron menores niveles de Klotho y niveles más altos de PTH, en las pacientes, sin observar diferencias en los niveles de FGF-23.

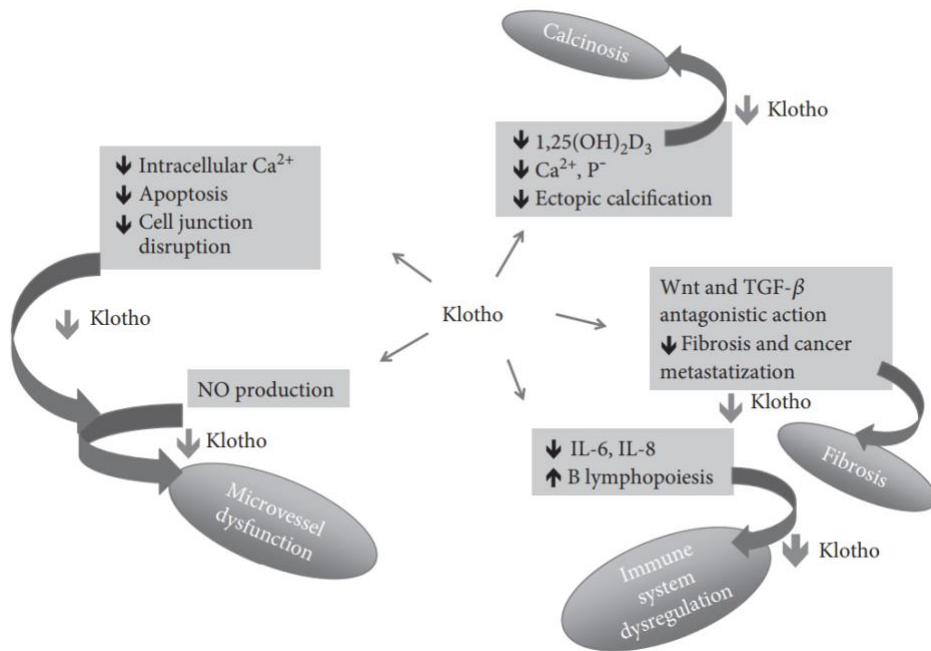
En el estudio publicado por *Hajjalilo et al (90)*, realizaron una comparación entre niveles de endotelina-1, Klotho y Vitamina D en una cohorte de 60 pacientes frente a 60 controles, encontrando que las pacientes presentan de forma significativa unos niveles más altos de endotelina-1 y más bajos de Klotho, pero sin encontrar correlación con la gravedad de la enfermedad. Esto se puede explicar porque ET-1 está implicada de forma importante en el funcionamiento del riñón, y se ha comprobado que el aumento de los niveles de ET-1, está asociado con un descenso de la expresión de Klotho.

En noviembre de 2018, *Kotyła et al (91)*, un grupo polaco, han comparado de nuevo los niveles de las moléculas entre pacientes y sujetos sanos encontrando diferencias con niveles más bajos de FGF-23 y vitamina D en las pacientes. Puesto que las moléculas están correlacionadas entre sí, proponen como posible marcador que pueda reflejar una relación de ambas proteínas (iFGF-23/ α -Klotho). Analizando esto último, obtienen en pacientes con ES, el \log_{10} iFGF-23/ α -Klotho es más bajo que en los controles.

En cuanto a las manifestaciones de la enfermedad, el grupo de *Mazzotta et al (92)* demostró que la adición de α -Klotho soluble a las células endoteliales humanas cultivadas in vitro, tiene efectos proangiogénicos que permiten la

cicatrización de heridas. Otro estudio investigó la asociación entre los niveles séricos de Klotho y patrones capilaroscópicos del pliegue ungueal encontrando que los niveles bajos de Klotho estaban relacionados con peores patrones capilaroscópicos.

Figura 9. Posible papel de Klotho en la patogénesis de la ES. Tomado de *Talotta et al* (88).



Niazy et al incluyeron en su estudio 42 pacientes y 27 controles, encontrando también diferencias significativas en cuanto a los niveles en sangre de Klotho siendo en las pacientes más bajo, tal y como ocurre en otros estudios anteriormente expuestos (93). En este caso observaron que las pacientes con telangiectasias tenían niveles de α -Klotho en sangre más elevados.

II.JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que los sujetos con ES presentan una mayor mortalidad CV que la población de la misma edad y sexo. Esto se debe al desarrollo de un proceso de aterogénesis acelerada. La mejoría en los tratamientos actuales permite un aumento de la esperanza de vida en estos pacientes y, por lo tanto, se ha incrementado la incidencia de la ECV, que se ha erigido en una de las principales causas de muerte y de comorbilidad en estos pacientes. Actualmente, y según un metanálisis reciente, la mortalidad por ECV está en torno al 20-30% (94). Además, se ha publicado un artículo donde se observa que existe un aumento de hospitalizaciones en pacientes con ES por causa cardiovascular como primer diagnóstico, por lo que representa la primera evidencia del aumento de morbilidad por esta causa, que se ha incrementado en comparación con otras enfermedades autoinmunes como la AR y el LES (95). El incremento de episodios CV en sujetos con ES es independiente de la presencia de los factores tradicionales de riesgo CV y la información sobre marcadores serológicos de ECV en pacientes con ES es limitada.

Por todo lo descrito anteriormente resulta interesante profundizar en los factores que incrementan el RCV en este caso, y disminuir la arterioesclerosis, la tasa de cardiopatía isquémica e ictus que sufren estos pacientes, no solo con la intención de prevenirlos sino de mejorar la ECV ya establecida aumentando la calidad de vida.

Por otra parte la ES se asocia con una disminución de la masa ósea y la aparición de fracturas, esto puede ser debido a múltiples factores, entre los que se encuentran el uso de diferentes fármacos como los glucocorticoides o el grado de inflamación de la enfermedad. Pese a esto, la etiología de la pérdida progresiva de masa ósea en los pacientes con ES permanece aún sin aclarar.

FGF-23 y su receptor Klotho son dos moléculas que se conocen desde hace relativamente poco tiempo e implicadas en una gran cantidad de procesos como la calcificación vascular, o de tejidos blandos, la hipertrofia de ventrículo izquierdo o la mineralización ósea, entre otras.

El estudio de estas dos moléculas en pacientes con ES tiene el objetivo de analizar cómo influyen en el metabolismo fosfocálcico, en la enfermedad cardiorrenal, el desarrollo de arteriosclerosis, presencia de baja densidad ósea y calcificaciones extraóseas y ver si juegan algún papel en la patogenia de algunas de dichas manifestaciones. De encontrar que el binomio FGF-23/Klotho, jugara algún papel en el desarrollo de las complicaciones descritas, podrían ser una posible diana terapéutica en tratamientos futuros.

Actualmente existen escasos artículos en la literatura que estudien el papel de estas dos moléculas en enfermedades autoinmunes sistémicas, por lo que es de gran interés, continuar realizando estudios y tratar de identificar biomarcadores, que ayuden a comprender mejor estas enfermedades, y avanzar en la obtención de fármacos que mejoren el pronóstico de las mismas.

III. HIPÓTESIS.

Comprobado el aumento de incidencia de ECV en ES, y conociendo que probablemente existan una serie de factores de crecimiento, reactivos inflamatorios y moléculas que participen en el desarrollo de su afectación vascular y cardíaca, así como en la alteración en el remodelado óseo, nuestro trabajo participa en la búsqueda de biomarcadores que expliquen dicha patología. Basándonos en toda la bibliografía consultada, la hipótesis de este trabajo, consiste en la posible disregulación de las moléculas FGF-23 y Klotho como causa de un aumento de ECV y alteración del metabolismo óseo en ES. Los resultados esperables serían encontrar niveles elevados de FGF-23 y niveles disminuidos de Klotho al igual que ocurre en pacientes con ERC. Es esperable que esos niveles se relacionen con factores de riesgo cardiovascular clásicos y/o marcadores subrogados de enfermedad cardiovascular, al igual que con la presencia de baja masa ósea.

IV. OBJETIVOS.

El objetivo general de este estudio, es analizar el posible papel de FGF-23 y su correceptor Klotho en el desarrollo de diferentes complicaciones presentes en pacientes con esclerosis sistémica. De forma más concreta, analizar la posible relación entre FGF-23 y Klotho y el aumento de la predisposición a la ECV y la patología ósea existente en los pacientes con esclerosis sistémica. Se definen los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1): Cuantificar en sangre FGF-23 y su correceptor Klotho, comparar sus niveles con los de la población sana y valorar posible relación con los diferentes subtipos de enfermedad.

Objetivo 2): Correlacionar ambas moléculas con diferentes variables relacionadas con el riesgo CV, arterioesclerosis subclínica y disfunción cardiaca de las pacientes.

Objetivo 3): Analizar la posible relación de FGF-23 y Klotho con la masa ósea medida mediante densitometría. Correlacionar ambas moléculas con diferentes variables relacionadas con el eje hormonal que regula la calcemia y fosfatemia.

Objetivo 4): Valorar la posible relación entre FGF-23 y Klotho con diferentes manifestaciones clínicas asociadas a la esclerodermia como son las úlceras digitales y la calcinosis de tejidos blandos.

Objetivo 5): Analizar valores de homocisteína en pacientes y controles, así como su posible relación con el riesgo CV y metabolismo óseo.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Diseño y tipo de estudio.

Tipo de estudio: Estudio observacional transversal.

2. Población a estudio.

Población: Área sanitaria de la provincia de Granada, incluyendo pacientes de ambos centros hospitalarios, procedentes de la Unidad de enfermedades sistémicas.

Criterios de inclusión de los pacientes:

- Sexo femenino.
- Pacientes con esclerosis sistémica, entre 18 y 65 años de edad, que cumplan los criterios clasificatorios definidos en 2013 por la ACR y la EULAR, comentados anteriormente en la *Tabla 2*.

Criterios de exclusión de los pacientes:

- Sexo varón.
- Edades fuera de rango incluido en los criterios de inclusión.
- Se excluyen las formas de esclerodermia con afectación puramente cutánea como la morfea o esclerosis lineal.
- Se excluyen las pacientes con afectación pulmonar severa o con HAP.
- Pacientes en tratamiento con hemodiálisis.
- Pacientes con enfermedades concomitantes que puedan actuar como factor de confusión en el estudio.

Criterios de inclusión de los controles:

- Sexo femenino.
- Edad entre 18 y 65 años de edad que cumplan características similares al grupo de pacientes, de forma que no existan diferencias significativas entre ellas.
- Características similares al grupo de pacientes.

Cálculo del tamaño muestral: Considerando un intervalo de confianza del 95% con una precisión del 5%, se calculó un tamaño muestral necesario de 60 pacientes

en cada rama. Finalmente participaron 124 sujetos, dentro de los cuales se incluyeron 62 pacientes con esclerosis sistémica y 62 controles.

3. Variables del estudio.

3.1. Variables sociodemográficas y antecedentes personales:

- **Edad.**
- **Antecedentes familiares.**
- **Antecedentes personales.**
- **Hábitos tóxicos:** tabaco, alcohol.
- **Tratamiento:** medicación habitual, toma de IECAS, calcioantagonistas, β -bloqueantes, estatinas.
- **Tratamiento inmunosupresor:** corticoides, micofenolato, metotrexato...
- **Tratamiento** para la **osteoporosis** (vitamina D, bifosfonatos...).
- Prevalencia de **enfermedad ósea:** osteopenia y osteoporosis.
- **Cardiopatía** previa (definida como: eventos relacionados con arterioesclerosis como infarto agudo de miocardio con elevación de troponinas, cirugía o intervenciones de revascularización coronaria, cerebrovascular o periférica, o antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular).
- Prevalencia de enfermedades y factores de riesgo cardiovascular:
 - **DM tipo 2:** pacientes ya diagnosticados y en tratamiento específico, o con glucemia plasmática en ayunas (al menos 8 horas después de la última ingesta oral) ≥ 126 mg/dL.

- **Dislipemia:** incluyendo pacientes ya diagnosticados y en tratamiento hipolipemiente, o detección de colesterol total >200mg/dL, colesterol HDL <40mg/dL, colesterol LDL >160mg/dL o triglicéridos >150mg/dL.
- **HTA:** considerando pacientes ya diagnosticados y en tratamiento con fármacos antihipertensivos, o tensión arterial $\geq 140/90$ en el momento de la valoración.
- **Tabaquismo activo:** paciente con hábito tabáquico activo en algún momento de los últimos 12 meses.
- **Otras enfermedades relevantes para el riesgo cardiovascular:** hipotiroidismo, hiperuricemia.

3.2. Variables relacionadas con la esclerosis sistémica:

- **Tipo** de esclerosis sistémica: variante difusa, limitada y sine.
- **Año de diagnóstico y edad** de la paciente al diagnóstico.
- **Años de evolución** hasta el momento de inclusión.
- Presencia de **Raynaud:** definido como fenómeno de cambios de coloración secuencial de la piel con los cambios de temperatura u otros estímulos.
- Presencia de **calcinosis:** definida como la presencia de depósitos de calcio de predominio en dedos y zonas periarticulares de manos, pero se pueden extender a brazos y bursas de articulaciones de mayor tamaño.
- Presencia de **anticuerpos:** patrón de anticuerpos que presenta cada paciente: antitopoisomerasa, anticentromero, antiRNA polimerasa III, etc.

3.3. Variables antropométricas:

- **Peso** (kg) y **altura** (cm) de la paciente, calculando a partir de ambos su **Índice de masa corporal** (IMC, kg/m^2) mediante la división del peso (kg) entre el cuadrado de su talla (m^2). Se trata de un indicador del estado nutricional, que varía según el sexo y la edad, y nos permite identificar el sobrepeso y la obesidad en adultos.
- **Perímetro abdominal** (cm), medido con la paciente de pie y tras haber expulsado el aire, colocando la cinta métrica en el punto medio situado entre la cresta iliaca y la última costilla. Un perímetro abdominal mayor de 88 cm en mujeres y 102 cm en varones conlleva un aumento del riesgo cardiovascular.

3.4. Variables exploratorias:

- **Presión arterial** (PA, mmHg), medida con el paciente sentado tras 5 minutos de reposo, empleando un esfigmomanómetro automático validado OMROM modelo M3 HEM-7051T. En cada paciente se midió la PA en dos ocasiones separadas por un intervalo de 5 minutos, siendo la cifra de PA empleada la resultante de la media aritmética de ambas determinaciones.
- **Presión de pulso** (PP, mm Hg), definida como la diferencia entre la PAS y la PAD, es un indicador de la distensibilidad arterial. Su interpretación debe considerarse siempre en el contexto de los valores absolutos de PAS y PAD ya que, por ejemplo, el riesgo cardiovascular de un paciente con una PA de

120/80 mmHg no es equivalente al existente con 160/120 mmHg, pese a tener una PP igual.

- **Presión arterial media** (PAM, mmHg), calculada a partir de la PAS y PAD. Se trata de un parámetro que permite predecir el riesgo de ECV de un paciente independientemente de su edad. Se calcula mediante la siguiente fórmula (*Figura 10*):

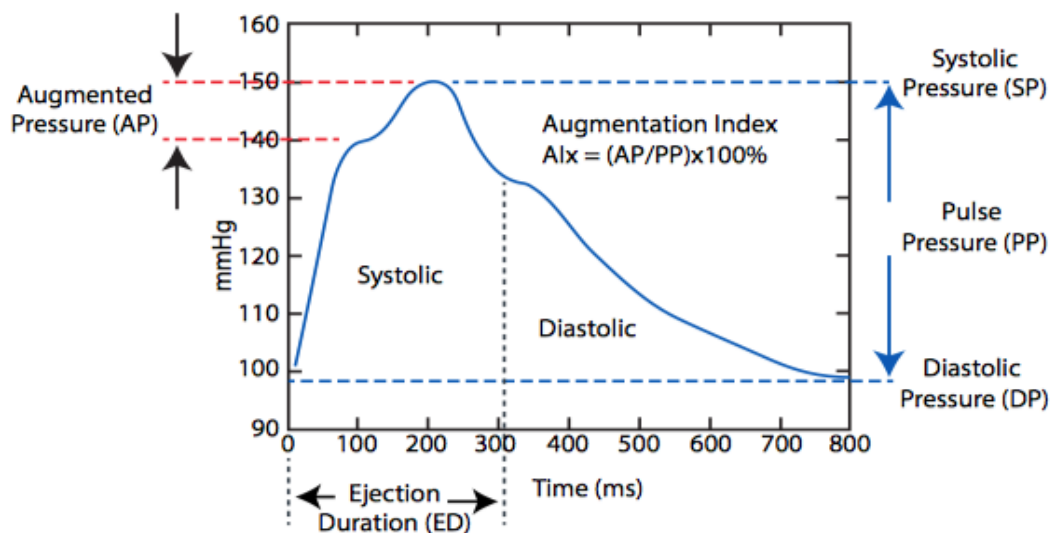
Figura 10: Fórmula de la PAM

$$\text{PAM} = \frac{\text{PAS} + 2\text{PAD}}{3}$$

- **Frecuencia cardiaca** (FC, Latidos por minuto (lpm)). Medimos la FC en reposo, ésta, junto con la FC máxima durante el ejercicio, así como la diferencia entre ambas (variabilidad de la FC), son FRCV clásicos que se asocian a mayor riesgo de morbimortalidad cardiovascular.
- **Velocidad onda del pulso** (VOP, (m/s): es el método más empleado para la estimación de la rigidez arterial y, con ello, la detección del grado de aterosclerosis precoz. El sistema Mobil-O-Graph® (I.E.M.,Germany) es un sistema validado para realizar estas mediciones. Aunque se han propuesto distintos métodos para establecer la normalidad y los valores de referencia de la VOP en la población general para la correcta interpretación de su incremento, éstos aún no están bien estandarizados en las distintas poblaciones. Por lo general, se define una VOP patológica o incrementada aquella cuyo valor fuese superior al del percentil 90 de la población (>9,5m/s). El dispositivo que utilizamos, además nos permite, además, el cálculo además de más parámetros que se describen a continuación:

- **Presión del pulso** (PP, mmHg): La presión del pulso o tensión diferencial es la diferencia entre la TAS y la TAD. Aumenta con la edad y se ha relacionado de forma independiente con mayor riesgo CV.
- **Gasto cardíaco** (GC, litros por minuto (l/min)): es el volumen de sangre expulsado por el ventrículo izquierdo durante un minuto. Sus valores habituales se encuentran entre 4.5-6 l/min.
- **Presión de aumento** (P aumento, mmHg): Se calcula como la diferencia entre los dos picos de presión durante la eyección (sístole), tal y como se observa en la *Figura 11*. El primer pico se relaciona con la eyección cardíaca y el segundo pico se relaciona con la reflexión de la onda debido a la rigidez arterial.
- **Índice de aumento** (Alx75, %): La onda de presión arterial está compuesta de la onda de presión incidente, creada por la contracción ventricular, y una onda reflejada. Las ondas se reflejan desde la periferia, principalmente en ramificaciones o sitios de desajuste de impedancia. En los vasos elásticos, porque la VOP es baja, la onda reflejada tiende a regresar a la raíz aórtica durante la diástole. En el caso de las arterias rígidas, la VOP aumenta y la onda reflejada regresa antes a las arterias centrales, sumándose a la onda incidente y aumentando la presión sistólica. Este fenómeno se puede cuantificar a través del índice de aumento (Alx) definido como la diferencia entre el segundo y el primer pico sistólico, expresado como un porcentaje de la presión del pulso (*Figura 11*). Estudios han demostrado que los pacientes con diabetes tienden a presentar un elevado Alx, lo que indica mayor rigidez arterial y un mayor riesgo de daños orgánicos. El Alx se corrige para una frecuencia cardíaca de 75 latidos por minuto.

Figura 11: Gráfica de las características de la Onda del Pulso.



- **Resistencia vascular periférica:** la resistencia que se opone a la salida de sangre del VI.
- **Presión central sistólica:** existente en la raíz aórtica (para la mayoría de los dispositivos de medición no invasiva) o en el inicio de la arteria subclavia izquierda. Su medición solo es posible invasivamente, pero su determinación indirecta puede realizarse de forma no invasiva.
- **Coefficiente de reflexión:** que se define como la relación entre la onda incidente y la onda reflejada. El módulo de dicho coeficiente se calcula como el cociente de la amplitud de la onda reflejada sobre la amplitud de la incidente.

3.5. Variables analíticas:

- Hemograma: **hematíes** ($\times 10^6/\mu\text{L}$), **hemoglobina** (Hb, g/dL), **volumen corpuscular medio** (VCM, fL), **leucocitos** totales (células/ μL), **neutrófilos** totales (células/ μL), **linfocitos** totales (células/ μL), **plaquetas** (células/ μL).
- Bioquímica: **glucosa** (mg/dL), **urea** (mg/dL), **creatinina** (mg/dL), **ácido úrico** (mg/dL), **bilirrubina total** (BT, mg/dL), **GOT** (U/L), **GPT** (U/L), **GGT** (U/L), **fosfatasa alcalina** (FAI, U/L), **hierro** ($\mu\text{g}/\text{dL}$), **ferritina** (ng/mL), **calcio** (mg/dL), **fósforo** (mg/dL), **proteínas totales** (g/dL), **albúmina** (g/dL), **CPK** (U/L), **LDH** (U/L).
- Perfil lipídico: **colesterol total** (mg/dL), **colesterol HDL** (mg/dL), **colesterol LDL** (mg/dL), **triglicéridos** (mg/dL).
- Función renal: niveles de **creatinina**, **urea**, y cálculo del **filtrado glomerular**, mediante la fórmula CKD-EPI.

- Mujeres:

- * Si creatinina ≤ 62 : FG estimado = $144 \times ([\text{creatinina}/88,4/0,7]^{-0,329}) \times 0,993^{\text{edad}}$.

- * Si creatinina > 62 : FG estimado = $144 \times ([\text{creatinina}/88,4/0,7]^{-1,209}) \times 0,993^{\text{edad}}$.

- Hombres:

- * Si creatinina ≤ 80 : FG estimado = $141 \times ([\text{creatinina}/88,4/0,9]^{-0,411}) \times 0,993^{\text{edad}}$.

- * Si creatinina > 80 : FG estimado = $141 \times ([\text{creatinina}/88,4/0,7]^{-1,209}) \times 0,993^{\text{edad}}$.

- **Homocisteína** ($\mu\text{mol}/\text{L}$): es un aminoácido capaz de ejercer un daño endotelial tanto directa como indirectamente por distintos mecanismos: ejerce una acción protrombótica, promueve la proliferación del músculo

- liso de la pared vascular, favorece la oxidación del colesterol LDL, aumenta la producción de colágeno, y disminuye la disponibilidad de óxido nítrico.
- **Péptido atrial natriurético (BNP)**, (pg/mL): útil para detectar disfunción cardiaca precoz.
 - **PCR** (mg/dL): componente de la inmunidad innata que participa frente a un daño tisular, inflamación o infección
 - **VSG** en la primera hora (VSG 1ªh, mm): es otro reactante de fase aguda inespecífico, útil para diferenciar entre procesos inflamatorios y no inflamatorios, y que ejerce un papel independiente y bien conocido en la génesis de la aterosclerosis.
 - Estudio metabolismo fosfocálcico: **Vitamina D** (ng/mL) y **PTH** (pg/mL).
 - **Hormona estimulante del tiroides** (TSH, μ U/mL).
 - Niveles de **endotelina-1 (pg/ml)**, **FGF-23** y **Klotho**: determinados mediante ELISA, con el kit (Elabscience, USA), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

3.6. Variables electrocardiográficas y ecocardiográficas:

- **Electrocardiograma de 12 derivaciones**: para valorar la **FC** en lpm, datos de HVI, de forma rápida. Valorar alteraciones del segmento ST y alteraciones del ritmo.
- **Medición del intervalo QT**: es el tiempo en segundos (s) transcurrido entre el comienzo de la onda Q y el final de la onda T en el ECG. Su valor depende inversamente de la FC, motivo por el que su cálculo debe ajustarse a la misma mediante el empleo de la fórmula de Bazett (*Figura 12*), obteniendo

así el valor del **intervalo QT corregido** (QTc), oscilando su valor normal en adultos entre 0.35s y 0.44s (0.45s en mujeres).

Figura 12. Cálculo del intervalo QT corregido.

$$QTc = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$$

- **Ecocardiografía:** valora si existe disfunción sistólica del ventrículo izquierdo relacionado con la fibrosis miocárdica, disfunción diastólica y /o presencia de derrame pericárdico. Mediremos los siguientes parámetros: **fracción de eyección del ventrículo izquierdo** (FEVI), **diámetro de la aurícula izquierda** (DiamAI), **diámetro diastólico del VI** (DiamDVI), **diámetro sistólico del VI** (DiamSVI), **masa VI**, **diámetro de septo interventricular** (Diamsepto), **grosor Pared posterior** (GrosorPP), **onda A**, **onda E**, **relación onda E/A** (EA), **presión estimada de la arteria pulmonar** (PAPs).

3.7. Variables para estudio de enfermedad ósea:

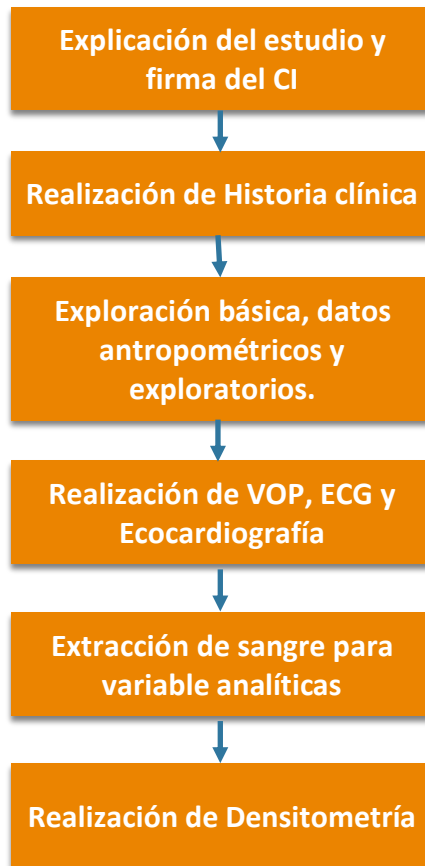
- Medición de masa ósea mediante **densitometría ósea** en columna lumbar (L1-L4) y fémur proximal.
- **Índice FRAX:** se obtiene a través de la calculadora online (www.shef.ac.uk/FRAX), usando datos clínicos y de DMO. Esta herramienta establece un punto de corte para predecir el riesgo de fractura osteoporótica mayor (MOF) y el riesgo de fractura de cadera (HF) en los próximos 10 años.

4. Recogida de datos.

Se seleccionaron a las pacientes que cumplan los criterios de inclusión y se realizó una entrevista individual en la que se explicó el procedimiento del estudio y se ofertó su participación de forma voluntaria. A las pacientes y controles que decidieron incluirse, se les facilitó, la documentación incluida en el *Anexo 2*, donde tanto investigador como paciente firmaron el consentimiento informado de inclusión en el estudio.

Tras su inclusión se siguió el esquema de obtención y recogida de datos que aparece en la *Figura 13*. En cada sujeto de ambos grupos, tras la firma del CI, se completó la ficha de recogida de datos, con la información epidemiológica, clínica y terapéutica comentada, completada y contrastada con la recogida en su historia clínica. Seguidamente se realizó una exploración física básica, incluyendo la medición de los datos antropométricos y exploratorios detallados, así como la realización de la ecocardiografía, VOP y un ECG. Una vez completado todo este reconocimiento, se procedió a la extracción de la sangre en ayunas para el estudio analítico (muestras extraídas por el personal de enfermería del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y procesadas según los métodos de rutina de dicho Hospital), obteniendo los resultados analíticos. Finalmente, se indicó a cada sujeto, la cita en Medicina Nuclear para acudir a realizarse la densitometría ósea.

Figura 13. Algoritmo de recogida de datos de cada paciente del estudio.



5. Análisis estadístico.

Se realizó una base de datos con todas las variables antes expuestas. Se analizó dicha base utilizando el programa SPSS en su versión 21 y el software R en su versión R-4.2.0. Para la comparación de ambos grupos se utilizaron contrastes paramétricos (t- Student para muestras dependientes e independientes) y no paramétricos (U de Mann-Whitney-Wilconxon para muestras dependientes e independientes). La normalidad en la distribución de las variables se estudió mediante el contraste de Shapiro-Wilks. La relación entre variables continuas se

estudió mediante coeficientes de correlación (Sperman y Pearson) y la estimación de modelos de regresión lineal simple. Para estudiar la relación entre variables categóricas utilizamos los contrastes Chi-Cuadrado y Fisher. Las variables continuas fueron expresadas en medias y desviaciones estándar, mientras que las variables categóricas se muestran en frecuencias y porcentajes. Consideramos estadísticamente significativo los valores de P inferiores a 0.05. Los intervalos de confianza se calcularon al 95%.

6. Aspectos éticos.

El estudio se llevó a cabo en base a los principios éticos y deontológicos actuales. Como se ha comentado anteriormente, fue obtenido el consentimiento informado por escrito de todos los individuos participantes en este estudio.

Se ha respetado en todo momento, mediante la anonimidad de datos en la base, la confidencialidad de los mismos, de acuerdo con el RD 1720/2007 que desarrolla la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos. No existe conflicto de intereses por su parte los investigadores de este proyecto.

VI.RESULTADOS

1. Descripción de las características de las pacientes con esclerosis sistémica y de los controles.

1.1 Características antropométricas.

Las características antropométricas de los sujetos a estudio se muestran en la *Tabla 3*. Un total de 62 mujeres afectas de ES y 62 mujeres sanas se incluyeron en nuestro estudio. La mayoría de las pacientes y de los controles eran caucásicas, el

90,5% y 98,3% respectivamente. La edad de las mujeres con ES y los controles fue similar, tampoco hubo diferencias en el peso, en el IMC, en la altura, ni en el perímetro abdominal.

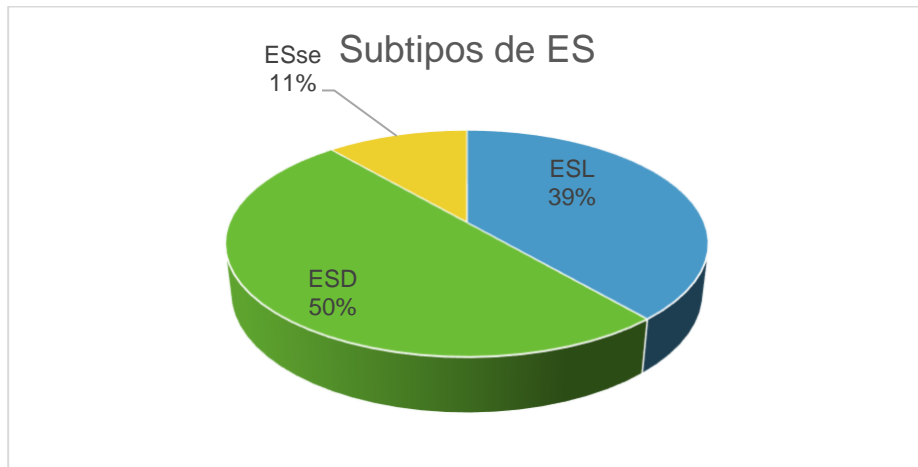
Tabla 3. Características antropométricas de las pacientes con ES y los controles.

	ES	Controles sanos	
	Media \pm DE	Media \pm DE	P valor
Edad (años)	53,2 \pm 10,1	52,7 \pm 9,7	0,71
Altura (cm)	159,5 \pm 5,6	160,9 \pm 7,1	0,23
Peso (kg)	66,8 \pm 12	67,2 \pm 12	0,52
IMC (kg/m²)	26,3 \pm 4,9	25,9 \pm 4,3	0,49
Perímetro abdominal (cm)	83,5 \pm 11	83,1 \pm 13,4	0,64

Puesto que la enfermedad en estudio tiene diferentes variantes, y las pacientes se encuentran clasificadas en las mismas, resulta interesante también describir las características de los subgrupos y compararlos entre si.

La media de años de evolución de la enfermedad, hasta el momento de inclusión en el estudio, fue de 8,8 \pm 6,9 años. Veinticuatro de las pacientes estaban diagnosticadas de la variante ESL, lo que supone el 39% de las pacientes y treinta y uno pertenecían a la ESD, un 50%, siendo las siete restantes (11,3%) de la variante ESse, tal y como se muestra en la *Figura 14*.

Figura 14. Subtipos de ES de las pacientes de nuestro estudio.



En cuanto a variables antropométricas, comparando los tres subgrupos de enfermedad, únicamente se encontraron diferencias significativas en el perímetro abdominal, siendo mayor en las pacientes con la variante ESD. No se encontraron diferencias en el resto de variables, tal y como muestra la *Tabla 4*.

Tabla 4. Características antropométricas de los subtipos de ES.

	ESL	ESD	ESse	
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	P valor
Edad (años)	54,5 ± 11,7	52,5 ± 9,3	53,9 ± 6,9	0,42
Altura (cm)	157,9 ± 5,0	160,0 ± 5,3	160,6 ± 6,9	0,28
Peso (kg)	65,8 ± 10,2	69,3 ± 13,6	59,1 ± 7,5	0,12
IMC (kg/m²)	26,6 ± 4,3	26,9 ± 5,5	23,4 ± 3,5	0,18
Perímetro abdominal (cm)	83,9 ± 9,5	85,8 ± 11,6	72,9 ± 7,7	0,01

1.2. Comorbilidades y tratamiento habitual.

Se describen en la *Tabla 5* los antecedentes personales relevantes tanto de las pacientes como del grupo control. Entre los antecedentes personales del grupo de pacientes con ES destacaban dislipemia (33,8%), HTA (12,9%) y diabetes mellitus

tipo 2 (3,2%). Destacar diferencias significativas en cuanto al consumo de tabaco, de forma que en el grupo control, el porcentaje de fumadoras es mayor.

Puesto que el tabaco es un factor de riesgo cardiovascular y puede ser una variable que ofrezca confusión, se realizó un análisis para comprobar si había diferencias entre fumadores y no fumadores, tanto en el grupo control como en las pacientes. Tras realizar el ajuste por la variable tabaco y dividir los casos y control es en fumadores y no fumadores, no se observan diferencias significativas en ninguna de las variables siendo los valores de P no significativos.

Los fármacos consumidos con mayor frecuencia fueron los antihipertensivos, fundamentalmente CA (32,2%) con diferencias significativas respecto a los controles, posiblemente porque buena parte de las indicaciones se deban al tratamiento del fenómeno de Raynaud. También tomaban ARAII (8,1%), IECAs (3,2%), y diuréticos (1,6%), en proporción muy similar al grupo control. En el momento del estudio, 5 pacientes tomaban prednisona, siendo la dosis media diaria de fue $6,5 \pm 3,5$ mg/día. Tres pacientes estaban en tratamiento con metotrexato.

Tabla 5. Comorbilidades y tratamiento de las pacientes con ES y los controles.

	ES	Controles sanos	
	Media \pm DE	Media \pm DE	P valor
Fumadoras, n (%)	11 (17,7)	15 (24,2)	0,04
Hipertensión, n (%)	8 (12,9)	11 (17,7)	0,87
Diabetes mellitus, n (%)	2 (3,2)	2 (3,2)	0,62
Dislipemia, n (%)	21 (33,8)	14 (22,5)	0,17
IECAs, n (%)	2 (3,2)	3 (4,8)	1

ARA II, n (%)	5 (8,1)	5 (8,1)	1
Diureticos de asa, n (%)	1 (1,6)	2 (3,2)	1
Calcioantagonistas, n (%)	20 (32,2)	1 (1,6)	<0,001
Prednisona n, (%)	5 (3,1)	-	-
Metotrexate n, (%)	3 (1,8)	-	-

Las comorbilidades y tratamiento según los subtipos de enfermedad, se encuentran descritos en la *Tabla 6*. En cuanto a comorbilidades y enfermedades concomitantes, no encontramos diferencias significativas en los FRCV clásicos. Tampoco hubo diferencias respecto a la presencia de hiperuricemia, trastornos tiroideos y otras enfermedades autoinmunes asociadas como, el síndrome de Sjögren. Respecto a las variables clínicas de la enfermedad, doce pacientes (19%) presentaban calcinosis, de las cuales 6 pacientes correspondían a ESL y otras 6 al subtipo EDS. Todas las pacientes (100%) presentaban fenómeno de Raynaud.

En cuanto al tratamiento farmacológico, se describen en la misma tabla los más frecuentemente recibidos por las pacientes, encontrando diferencias significativas en la toma de CA y las estatinas, ambos más consumidos en la variante ESD. Se compararon también otros inmunosupresores como la hidroxicloroquina, el micofenolato y la azatioprina sin diferencias significativas. En cuanto a fármacos específicos, como el sildenafil y el bosentán, utilizados básicamente en el tratamiento y profilaxis de fenómeno de Raynaud y úlceras digitales, tampoco se encontraron diferencias significativas.

Tabla 6. Comorbilidades y tratamientos de los subtipos de esclerosis sistémica.				
	ESL	ESD	ESse	P valor

Fumadoras, n (%)	4 (40)	5 (50)	1 (10)	0,78
Hipertensión, n (%)	3 (37,5)	5 (62,5)	0 (0)	0,41
Diabetes mellitus, n (%)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0,36
Dislipemia, n (%)	8 (38,1)	10 (47,6)	3 (14,3)	0,41
IECAs, n (%)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0,10
ARA II, n (%)	6 (35,3)	8 (47,1)	3 (17,6)	0,33
Diureticos de asa, n (%)	1 (25)	3 (75)	0 (0)	0,43
Calcioantagonistas, n (%)	4 (22,2)	12 (66,7)	2 (11,1)	0,007
Estatinas, n (%)	4 (22,2)	12 (66,7)	2 (11,1)	0,007
Prednisona, n (%)	1 (20)	3 (60)	1 (20)	0,29
Metotrexate n, (%)	1 (33)	1 (33)	1 (33)	0,47

1.3. Resultados de laboratorio.

Los resultados de laboratorio de los pacientes y de los controles sanos se presentan en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Resultados de laboratorio de las pacientes y controles.			
	ES	Controles sanos	
	Media ± DE	Media ± DE	P valor
FGF-23 (pg/ml)	78,2 ± 60,5	80,3 ± 56,3	0,66
Klotho (ng/ml)	3,5 ± 1,4	3,4 ± 1,2	0,71
Endotelina-1 (pg/ml)	21,4 ± 10,6	21,1 ± 11,7	0,62
Fósforo sérico (mg/dl)	3,6 ± 0,5	3,4 ± 0,5	0,04
Calcio sérico (mg/dl)	9,5 ± 0,3	9,4 ± 0,4	0,05
25(OH)D (ng/ml)	26 ± 12	23,1 ± 7,3	0,31
PTH intacta (pg/ml)	50,7 ± 27,3	54,9 ± 19,6	0,02
Fosfatasa alcalina (IU/L)	104 ± 130,5	72,9 ± 19,5	0,07
Osteocalcina (g/L)	17,6 ± 8,8	19,3 ± 8,9	0,27
Telopéptido C terminal (g/L)	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,31
Propéptido N terminal (g/L)	46,8 ± 23,7	45,9 ± 15,1	0,80
Colesterol (mg/dl)	199,8 ± 34,9	211,8 ± 37,3	0,06
LDL-C (mg/dl)	122,1 ± 32	129,7 ± 30,7	0,17
HDL-C (mg/dl)	57,8 ± 15,5	63,3 ± 13,1	0,03
Triglicéridos (mg/dl)	105,2 ± 54,1	107,7 ± 53,9	0,79

Ácido úrico (mg/dl)	4,6 ± 1	4,6 ± 1,3	0,91
BNP (pg/ml)	79,8 ± 54,8	59,7 ± 38,4	0,01
Glucosa (mg/dl)	88,4 ± 9,4	92,1 ± 13,0	0,07
PCR (mg/dl)	0,4 ± 0,4	0,2 ± 0,1	<0,001
VSG (mm/h)	21,1 ± 16	11,3 ± 10,2	0,007
Creatinina, mg/dl	0,7 ± 0,8	0,7 ± 0,2	0,12
Filtrado Glomerular (ml/min)	93,0 ± 17,2	97,0 ± 13,2	0,19
Homocisteína (µmol/l)	11,9 ± 3,3	10,3 ± 2,3	0,002
Tirotropina (µU/mL)	2,6 ± 1,2	2,2 ± 1,2	0,09

Analíticamente, no encontramos diferencias significativas en las moléculas a estudio, FGF-23 ni en Klotho. A nivel de metabolismo óseo, destacan diferencias significativas en niveles de calcio, fósforo y PTH. En cuanto al perfil lipídico, las pacientes tienen valores menores del HDL, con una media de 57,8 mg/dl ± 15,5, frente a 63,3 mg/dl ± 13,1 de los controles. Ninguno de las participantes tenía alteración de los valores de creatinina y del filtrado glomerular (factor de exclusión del estudio). El valor medio de la homocisteína en las pacientes, fue de 11,9 µmol/l ± 3,3, superior significativamente en comparación con los controles que presentaron unas cifras medias de 10,3 µmol/l ± 2,3.

A destacar también, que los marcadores de laboratorio de inflamación encontrados en el momento del estudio, aunque dentro de la normalidad, mostraron valores más elevados en las mujeres con ES que en los controles. La PCR media en pacientes con ES fue de 0,4 ± 0,4 mg/dl frente a 0,2 ± 0,1 mg/dl en controles (p = 0,007). Asimismo, la VSG media en el grupo de pacientes con ES fue de 21,1 ± 16 mm/h, frente a 11,3 ± 10,2 mm/h en controles (p <0,001). Los pacientes con ES también presentaron unos niveles más elevados de BNP.

En el análisis de subgrupos, basado en formas ESD, ESL y ESse de la enfermedad, no se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de FGF-23, Klotho ni ET-1, tal y como muestra la *Tabla 8*. No encontramos diferencias entre el resto de parámetros analíticos estudiados.

Tabla 8. Resultados de laboratorio de las pacientes y controles.				
	ESL	ESD	ESse	
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	P valor
FGF-23 (pg/ml)	95,4 ± 78,7	92,2 ± 93,3	59,6 ± 31,1	0,78
Klotho (ng/ml)	3,1 ± 1,2	3,8 ± 1,4	4 ± 1,4	0,18
Endotelina-1 (pg/ml)	18,7 ± 11,3	23 ± 9,9	21,5 ± 10,7	0,47
Fósforo sérico (mg/dl)	3,7 ± 0,5	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,8	0,52
Calcio sérico (mg/dl)	9,5 ± 0,3	9,4 ± 0,4	9,6 ± 0,5	0,81
25(OH)D (ng/ml)	28,4 ± 12,4	22,4 ± 6,7	34,5 ± 21,8	0,16
PTH intacta (pg/ml)	53 ± 34,2	50,5 ± 23,4	43,9 ± 18,7	0,73
Fosfatasa alcalina (IU/L)	127,4 ± 201,7	91,1 ± 84,6	82,9 ± 46	0,75
Osteocalcina (g/L)	18,1 ± 9,7	17,9 ± 8,3	15,8 ± 8,4	0,73
Telopéptido C terminal (g/L)	0,3 ± 0,2	11,1 ± 58,9	0,4 ± 0,2	0,45
Propéptido N terminal (g/L)	43,8 ± 21,4	48,2 ± 25,1	52,7 ± 28,3	0,55
Colesterol (mg/dl)	202.8 ± 42.0	198.0 ± 29.2	197,6 ± 38,2	0,96
LDL-C (mg/dl)	119.9 ± 30.4	124.8 ± 35.2	120,3 ± 28,5	0,82
HDL-C (mg/dl)	60.7 ± 20.1	55.2 ± 10.5	58,9 ± 17,3	0,76
Triglicéridos (mg/dl)	105.3 ± 72.1	106.5 ± 40.9	93,1 ± 35,7	0,64
Ácido úrico (mg/dl)	4,5 ± 1,1	4,8 ± 1,1	4,6 ± 0,9	0,73
BNP (pg/ml)	43,5 ± 34,8	42,2 ± 21,8	29,4 ± 23,6	0,21
Glucosa (mg/dl)	88,6 ± 10,7	88,9 ± 8,6	87,1 ± 9,4	0,89
PCR (mg/dl)	5,5 ± 5,5	3,3 ± 3,5	2,3 ± 1,3	0,37
VSG (mm/h)	22 ± 20,9	21,6 ± 11,6	12,0 ± 6,7	0,18
Creatinina, mg/dl	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,11
Filtrado Glomerular (ml/min)	95,5 ± 17,4	90 ± 18,1	96,2 ± 12,7	0,51
Homocisteína (μmol/l)	12,4 ± 4,3	11,7 ± 2,4	11,0 ± 2,9	0,71
Tirotropina (μU/mL)	2,7 ± 1,2	2,7 ± 1,2	1,8 ± 0,7	0,18

Respecto a presencia de anticuerpos, el 75,8% de las pacientes con ES presentaban ANAs positivos, el 54,1% ACA positivos y el 4,9% Anti-Scl70. La presencia de anticuerpos en cada subtipo se describe en la *Tabla 9*. Además, cuatro de las pacientes, el 6,4%, presentaban anticuerpos antiARNpol III.

Tabla 9. Presencia de anticuerpos en función de subtipo de ES.

	ESL	ESD	Esse	P valor
Anticentromero, n (%)	17 (53,1)	12 (37,5)	3 (9,4)	0,87
AntiSCL-70, n (%)	0 (0)	2 (66,7)	1 (33,3)	0,12
ANAs, n (%)	25 (54,3)	16 (34,8)	5 (10,9)	0,63

No hubo diferencias significativas en el estudio de las moléculas, cuando dividimos a las pacientes en cuanto a presencia o ausencia de cada uno de los tres anticuerpos. Con respecto a los niveles de FGF-23 (*Tablas 10, 11 y 12*), en presencia de anticuerpos anti-centrómero ($91,9 \pm 74,6$ pg/ml vs $87,4 \pm 91,5$, pg/ml; $p = 0,837$), ANAs ($85,7 \pm 87$ pg/ml frente a $104,2 \pm 63,3$, pg/ml; $p = 0,480$) y anticuerpo anti-Scl-70 ($74,6 \pm 37,2$ pg/ml frente a $90,7 \pm 84$, pg/ml; $p = 0,745$). Tampoco se encontraron diferencias en los niveles de Klotho ni de ET-1.

Tabla 10. Estudio de moléculas en ES en función de presencia de Ac.Anticentrómero.

	NO	SI	P valor
FGF-23 (pg/ml)	$87,4 \pm 91,5$	$91,9 \pm 74,6$	0,62
Klotho (ng/ml)	$3,6 \pm 1,3$	$3,5 \pm 1,4$	0,75
Endotelina-1 (pg/ml)	$21,2 \pm 10,5$	$22,1 \pm 10,3$	0,74

Tabla 11. Estudio de moléculas en ES en función de presencia de ANAS.

	NO	SI	P valor
FGF-23 (pg/ml)	104,2 ± 63,3	85,7 ± 87	0,10
Klotho (ng/ml)	4 ± 0,8	3,4 ± 1,5	0,09
Endotelina-1 (pg/ml)	19,9 ± 12,4	22,2 ± 9,7	0,63

Tabla 12. Estudio de moléculas en ES en función de presencia de AntiSlc-70

	NO	SI	P valor
FGF-23 (pg/ml)	90,7 ± 84	74,6 ± 37,2	0,93
Klotho (ng/ml)	3,5 ± 1,4	3,7 ± 1,1	0,69
Endotelina-1 (pg/ml)	22,2 ± 9,7	12 ± 18,4	0,30

1.4. Estudio y factores de riesgo de enfermedad cardiovascular.

Al analizar la rigidez arterial medida indirectamente con la VOP, no se observaron diferencias significativas entre las pacientes y los controles. Tampoco se observaron diferencias en las mediciones de TA, y resto de parámetros hemodinámicos, tal y como se muestra en la *Tabla 13*.

Tabla 13. Valoración de rigidez arterial en pacientes con ES y controles.

	ES	Controles sanos	P valor
	Media ± DE	Media ± DE	
VOP (m/s)	7,5 ± 1,2	7,3 ± 1,4	0,58
TAS (mmHg)	117,3 ± 15,2	118,1 ± 14,6	0,54
TAD (mmHg)	74,3 ± 11,5	76 ± 10,4	0,36
TAM (mmHg)	94 ± 11,8	95,3 ± 11,4	0,44
PP (mmHg)	43,2 ± 12,4	42 ± 10	0,86
P aumento (mmHg)	8,6 ± 5,8	8,8 ± 6,3	0,93
Gasto cardiaco (l/min)	4,8 ± 0,9	4,8 ± 0,9	0,75
Frecuencia cardiaca (lpm)	73,3 ± 12,5	69,7 ± 9,6	0,19
FC en ECG (lpm)	71,7 ± 12,9	68,1 ± 9,8	0,09
Intervalo QT en ECG (ms)	423,3 ± 23,3	409,5 ± 20,1	0,001
RVP (mmHg/ml)	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,64

Cociente RT (%)	68 ± 8	68,7 ± 6,6	0,43
Índice Aumento (AIx75, %)	24,2 ± 14,5	22,2 ± 14,1	0,45
PCS (mmHg)	107,7 ± 13,7	109,9 ± 13,4	0,24

En el ECG realizado a las pacientes durante el estudio, ninguna presentó alteraciones del ritmo ni signos de HVI, pero sí encontramos diferencias en la medición de la FC y en el intervalo QTc, siendo este más prolongado en las pacientes, con una medición de 423,3 ± 23,3 ms, frente a 409,5 ± 20,1 de los controles sanos.

En cuanto a los parámetros ecocardiográficos, se encuentran diferencias significativas en algunos de ellos. Las pacientes tendrían una FEVI menor y un diámetro de la aurícula izquierda, masa de VI, grosor de la pared posterior y una onda E aumentado respecto a los controles, tal y como se muestra en la *Tabla 14*.

Tabla 14. Medidas en ecocardiografía en pacientes con ES y controles.

	ES	Controles sanos	P valor
	Media ± DE	Media ± DE	
FEVI (%)	62,1 ± 3,9	63,3 ± 13,1	0,03
DiamAI, mm	33,8 ± 6,9	32,5 ± 3,8	0,07
DiamDVI, mm	43,5 ± 3,8	43,1 ± 3,6	0,36
DiamSVI, mm	25,3 ± 4,8	27,1 ± 2,9	0,17
MasaVI, gr	107,9 ± 34,9	92 ± 29,2	0,01
Diasepto, mm	8,6 ± 1,5	8,1 ± 1,5	0,06
GrosorPP, mm	8,1 ± 1,3	7,5 ± 1,4	0,05
OndaA, m/s	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,15
OndaE, m/s	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,01
EA ratio	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,4	0,60
PAPs, mmHg	33 ± 8,1	31,5 ± 3,3	0,94

Al comparar los parámetros ecocardiográficos de los 3 subtipos de pacientes no encontramos diferencias significativas, se muestran los datos en la *Tabla 15*.

Tabla 15. Medidas en ecocardiografía en subtipos de pacientes con ES.

	ESL	ESD	ESse	
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	P valor
FEVI, (%)	62,5 ± 2,8	61,8 ± 4,8	62,4 ± 2,5	0,89
DiamAI, mm	35,0 ± 5,1	34,7 ± 5,4	27,4 ± 12,7	0,28
DiamDVI, mm	43,8 ± 4,7	43,9 ± 3,1	41,4 ± 3,5	0,31
DiamSVI, mm	26,4 ± 4,5	26,1 ± 2,4	16,5 ± 12,0	0,32
MasaVI, mm	121,2 ± 46,6	95,7 ± 22,1	116,8 ± 22,5	0,07
Diasepto, mm	8,9 ± 1,9	8,2 ± 1,2	9,5 ± 1,0	0,10
GrosorPP, mm	8,5 ± 1,7	7,6 ± 1,1	8,3 ± 0,5	0,16
OndaA, m/s	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,24
OndaE, m/s	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,39
EA ratio	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,2	0,11
PAPs, mmHg	32,8 ± 5,4	33,7 ± 11,0	30,5 ± 3,7	0,86

1.5. Estudio y factores de riesgo de osteoporosis.

En cuanto a factores que influyen sobre la densidad ósea y la osteoporosis en nuestras pacientes, 44 eran menopáusicas. Tras valorar las densitometrías, observamos que 13 pacientes tenían osteoporosis, 28 tenían baja masa ósea, y 21 masa ósea normal.

Analizando los datos de los controles, de un total de 62 mujeres sanas, 36 tenían menopausia y 26 no. Tras valorar la densidad ósea, observamos que 9 tenían osteoporosis, 22 baja masa ósea y 31 una densidad ósea normal.

En cuanto a factores de riesgo para osteoporosis, los pacientes tenían un IMC medio de $26,3 \pm 4,9$ kg/m², tabaquismo (11 pacientes: 17,7%), diabetes mellitus (2 pacientes: 3,2%). Cinco pacientes (3,1%) habían recibido tratamiento con corticosteroides en los últimos 6 meses antes de la inclusión, con una dosis media de prednisona de $6,5 \pm 3,5$ mg/d. Los datos y valores de densidad ósea se muestran en *Tabla 16*.

Tabla 16. Valores de densitometría ósea en pacientes y controles sanos.			
	ES	Controles sanos	
	Media \pm DE	Media \pm DE	P valor
Fracturas por fragilidad, n (%)	6 (9,6)	2 (3,2)	0,04
FRAX-DMO, osteoporótica Mayor	5,3 (2,5)	4,9 (2,6)	0,47
FRAX-DMO, fractura de cadera	0,7 (1)	0,6 (1)	0,58
T-Score:			
- Lumbar	-1,2 \pm 1,1	-0,9 \pm 1,3	0,21
- Cuello femoral	-1,1 \pm 1,0	-0,7 \pm 1,4	0,10
- Cadera total	-0,8 \pm 0,9	-0,4 \pm 1,2	0,06
Z-Score:			
- Lumbar	0,1 \pm 1,0	0,1 \pm 1,2	0,39
- Cuello femoral	0,1 \pm 0,9	0,2 \pm 1,2	0,14
- Cadera total	0,1 \pm 0,9	0,3 \pm 1,1	0,11

Seis pacientes (9,6%) presentaron fracturas, 4 de ellas vertebrales. Según el algoritmo FRAX-BMD, ninguna de las mujeres con ES tenía un riesgo de MOF de más del 20 %. En cuanto a la fractura de cadera (HF), utilizando el algoritmo FRAX-

BMD, 3 (4,8%) pacientes tenían un riesgo superior al 3%. En cuanto a los controles, dos tenían fracturas (3,2%), ninguna de las cuales era vertebral. Al igual que las pacientes, ninguna de las mujeres sanas tenía riesgo de fractura mayor osteoporótica, de más del 20%. En cuanto a la HF, 3 controles sanos (4,8%), tenían un riesgo de más del 3%.

En cuanto a los valores en densitometría obtenidos y analizados por subgrupos destaca diferencias significativas en el Tscore y Zscore de columna lumbar, con disminución de la densidad ósea en el subtipo ESse, tal y como muestra la *Tabla 17*. Respecto al tratamiento para la osteoporosis, 42 (67,7%) de las pacientes no tomaban ningún tratamiento. El resto, 20 pacientes (32,2%) tomaban calcio y vitamina D, de las cuales 2 se encontraban en tratamiento con bifosfonatos y 4 en tratamiento con denosumab, no encontrando diferencias significativas entre los 3 subgrupos.

Tabla 17. Valores de densitometría ósea por subtipos de enfermedad.				
	ESL	ESD	ESse	
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	P valor
FRAX-MOF	5,5 (2,0)	5,0 (2,4)	6,0 (4,5)	0,370
FRAX-HF	0,7 (0,8)	0,7 (0,9)	1,2 (1,8)	0,377
T-Score:				
- Lumbar	-1,4 ± 1,0	-0,8 ± 1,1	-2,2 ± 0,4	0,003
- Cuello femoral	-1,1 ± 1,0	-1,0 ± 0,9	-1,5 ± 0,9	0,356
- Cadera total	-0,6 ± 0,8	-0,8 ± 0,9	-1,5 ± 0,7	0,068
Z-Score:				
- Lumbar	-0,1 ± 1,0	0,2 ± 0,9	-1,1 ± 0,5	0,004

- Cuello femoral	-0,0 ± 1,0	-0,1 ± 0,8	-0,6 ± 0,9	0,338
- Cadera total	0,2 ± 0,9	-0,1 ± 0,9	-0,8 ± 0,7	0,062

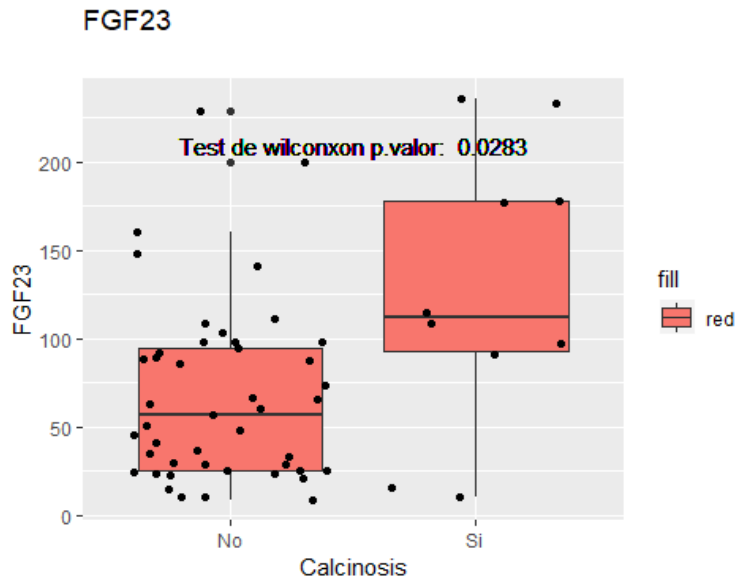
2. Estadística comparativa. Análisis de resultados y correlaciones.

2.1 Estudio de FGF-23.

2.1.1. Correlación entre los niveles de FGF-23 y las características de los pacientes con esclerosis sistémica.

No encontramos diferencias significativas entre los niveles de FGF-23, con las variables de las características de la enfermedad, tampoco con la variable tiempo de evolución de enfermedad, ni con la edad al diagnóstico. Puesto que la calcinosis es una manifestación de la enfermedad en la que podría implicarse FGF-23, por su relación con el metabolismo fosfocálcico, se subdividió a las pacientes en función de la presencia o no de calcinosis. Se observó una diferencia significativa en la concentración sérica de FGF-23 (que no se observó con Klotho ni con la ET-1). Los niveles de FGF-23 fueron más altos en pacientes con calcinosis ($156,7 \pm 126,1$ frente a $73,3 \pm 59,6$, pg/ml; $p = 0.028$) (Figura 15).

Figura 15. Niveles de FGF-23 en pacientes con y sin calcinosis.



2.1.2. Correlación entre los niveles de FGF-23 y los factores de riesgo cardiovascular en los pacientes con esclerosis sistémica.

Al analizar la relación existente entre FGF-23 y los distintos factores de riesgo cardiovascular, se demostró una correlación estadísticamente significativa con las siguientes variables: de forma **positiva**, es decir, cuando una aumenta la otra variable también, con la talla, peso, perímetro abdominal, TAD, PCR, y el diámetro sistólico del VI. Presenta una correlación **negativa**, con niveles de HDL, y el grosor pared posterior del ventrículo. La *Tabla 18* muestra los coeficientes de correlación entre FGF-23 y otros marcadores en pacientes con ES.

Tabla 18. Coeficiente de correlación entre niveles de FGF 23 y estudio de RCV.		
Variable	Coef de correlación de Pearson	P valor
Talla	0,29	0.02

Peso	0,34	0,01
Perímetro abd	0,34	0,00
TAD	0,29	0,03
Ácido úrico	0,25	0,07
GPT	-0,22	0,09
HDL	-0,32	0,01
PCR	0,29	0,03
DiamSVI	0,50	0,03
GrosorPP	-0,34	0,03

Realizando una regresión lineal de FGF-23, después de ajustar por las variables edad, tabaco, CKD-EPI e IMC, hemos encontrado las siguientes correlaciones, las cuales se muestran en la *Tabla 19*, con la siguiente interpretación de los datos:

Tabla 19. Regresión lineal múltiple de FGF-23 con el resto de variables.

Variable	Coefficiente	Intervalo 95%	P valor
Talla	3,402	(0,191, 6,612)	0,038
Peso	4,801	(1,064, 8,539)	0,012
Perímetro abd	4,108	(0,931, 7,284)	0,012
TAD	1,797	(0,131, 3,463)	0,035
T.aumento	-3,555	(-6,384, -0,726)	0,014
FC	1,468	(0,12, 2,816)	0,033
Ácido úrico	14,059	(-1,696, 29,814)	0,079
HDL	-1,331	(-2,456, -0,206)	0,021
PCR	4,788	(0,223, 9,353)	0,040
DiamSVI	6,360	(-0,506, 13,225)	0,066
GrosorPP	-15,116	(-29,383, -0,848)	0,038

- Por ejemplo, una correlación positiva con la variable peso, de forma que, por cada kilo de peso, FGF-23 aumenta un 4,801, con un valor de p de 0,012.

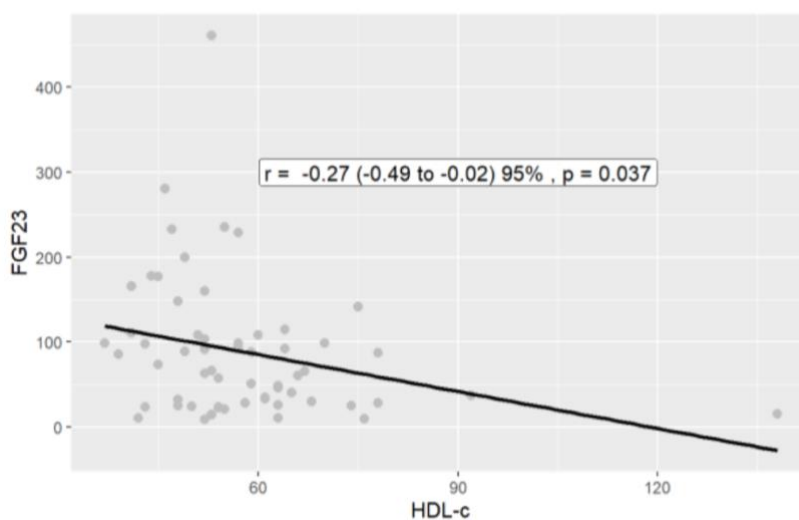
- Una correlación positiva con la variable perímetro abdominal, de forma que, por cada centímetro de perímetro, FGF-23 aumenta un 4,109, con un valor de p de 0,0123.

- Una correlación positiva con la variable tensión arterial diastólica, de forma que, por cada milímetro de mercurio, FGF-23 aumenta un 1,797, con un valor de p de 0,0351.

- Una correlación negativa con la variable Tensión de aumento, HDL y grosorPP, de forma que, estas tres variables disminuyen conforme aumenta los niveles de FGF-23.

Encontramos una relación inversa estadísticamente significativa entre las mediciones de FGF-23 y HDL ($r = -0,27$; $p = 0,03$) en mujeres con ES. Además, en el modelo de regresión lineal, las concentraciones más altas de FGF-23 se asociaron con HDL más bajo [$\beta = 1,45$, IC del 95% (-2,81, -0,08); $p < 0,05$] (*Figura 16*).

Figura 16. Correlación entre niveles de FGF3 y HDL.



No hubo correlación de los niveles de FGF-23 con el resto de variables a estudio.

2.1.3 Correlación entre los niveles de FGF-23 y los factores de riesgo de osteoporosis en los pacientes con esclerosis sistémica.

La *Tabla 20*, muestra los coeficientes de correlación entre FGF-23 y los parámetros del estudio óseo, en pacientes con ES, tras ajustar por edad. En cuanto a la predicción de riesgos de fractura osteoporótica en mujeres con ES, encontramos una correlación positiva entre FGF-23 y el índice FRAX tanto para fractura osteoporótica mayor como para FRAX de fractura de cadera, tal y como mostramos en la *Tabla 19*. Sin embargo, FGF-23 no se correlaciona con la edad, consumo de tabaco, consumo de prednisona, niveles de calcio y fósforo, PTH, niveles de vitamina D, IMC, fracturas, ni la densitometría ósea.

Tabla 19. Correlaciones entre FGF-23 y estudio óseo en pacientes con ES.

	Coeficiente de correlación	P valor
Edad	0,15	0,26
Talla	0,21	0,10
Peso	-0,01	0,91
IMC	-0,11	0,41
Tabaco	0,01	0,94
Duración enfermedad	0,11	0,41
Prednisona	0,56	0,22
PCR	0,10	0,32
VSG	0,18	0,18
Creatinina	0,24	0,06
Urea	0,09	0,48
FG (CKD-EPI)	-0,28	0,03
Fósforo	0,05	0,70

Calcio	-0,25	0,05
Vitamina D	-0,21	0,10
PTH	0,05	0,72
Osteocalcina	-0,10	0,46
CTX	-0,10	0,43
P1PN	-0,07	0,62
FRAX-BMD, MOF	0,27	0,04
FRAX-BMD, HF	0,30	0,01
Fracturas fragilidad	0,18	0,06
DMO lumbar (T-Score)	-0,15	0,26
DMO cadera (T-Score)	-0,21	0,10
DMO Total femur (T-Score)	-0,18	0,16
DMO lumbar (Z-Score)	-0,07	0,60
DMO cadera (Z-Score)	-0,17	0,19
DMO Total femur (Z-Score)	-0,17	0,20

En nuestro estudio, observamos correlaciones positivas entre FGF-23 y FRAX-MOF (*Figura 17*) y FRAX-HF (*Figura 18*) para predecir los riesgos de fracturas osteoporóticas en mujeres con ES.

Figura 17. Correlación entre FGF-23 y FRAX-MOF.

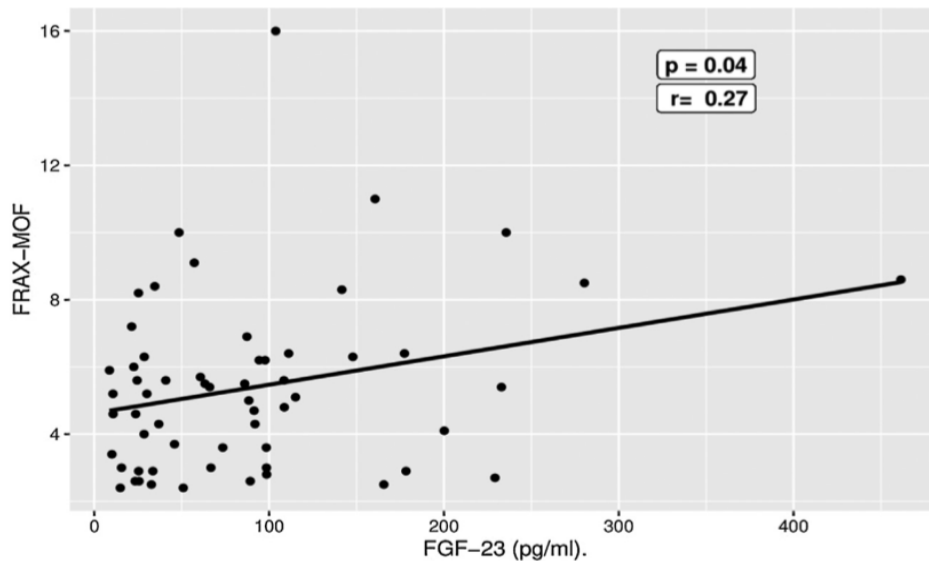
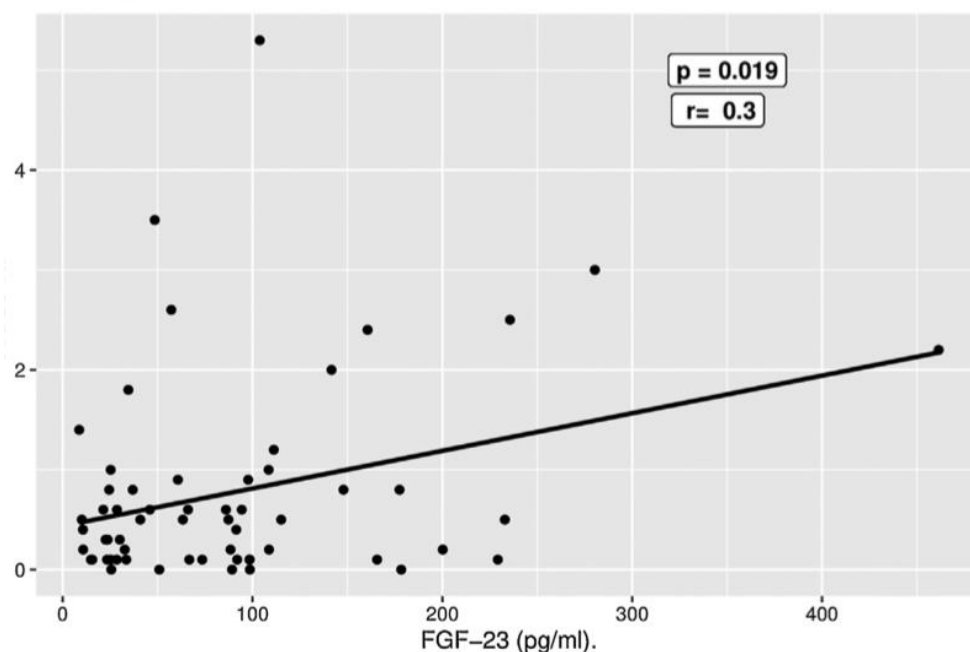


Figura 18. Correlación entre FGF-23 y FRAX-FC.



El análisis de regresión lineal múltiple en la *Tabla 21*, muestra la posible influencia de la edad, el IMC, el tabaquismo, los niveles séricos de FGF-23 y como el uso de prednisona no influye en la predicción de FRAX.

Tabla 21. Regresión múltiple de FRAX MOF y FRAX HF con el resto de parámetros en ES.

	FRAX MOF			FRAX HF		
	Coefic B	95% IC	P valor	Coefic B	95% IC	P valor
Edad	0,140	(0,09, 0,18)	0,001	0,023	(0,003, 0,043)	0,023
Tabaco	-0,340	(-1,47, 0,79)	0,551	-0,266	(-0,80, 0,26)	0,323
IMC	-1,264	(-2,42, -0,10)	0,032	-0,551	(-1,095, -0,006)	0,047
FGF-23	0,006	(0,001, 0,011)	0,029	0,003	(0,001, 0,006)	0,008
Prednisona	0,498	(-1,14, 2,14)	0,546	0,170	(-0,604, 0,944)	0,661

2.2 Estudio de Klotho.

2.2.1. Correlación entre los niveles de Klotho y las características de la enfermedad en los pacientes con esclerosis sistémica.

Existe una relación entre la edad al diagnóstico y los niveles de Klotho, de forma que, a más edad al diagnóstico, menos niveles de Klotho, con un valor de P de 0,04. Esto quiere decir que probablemente, Klotho se relacione de forma muy estrecha con la edad. No encontramos relación con el resto de variables como el IMC, la duración de la enfermedad o el tabaco, ni con el resto de características de la enfermedad de las pacientes.

Figura 19. Correlación entre los niveles de Klotho y la edad al diagnóstico.

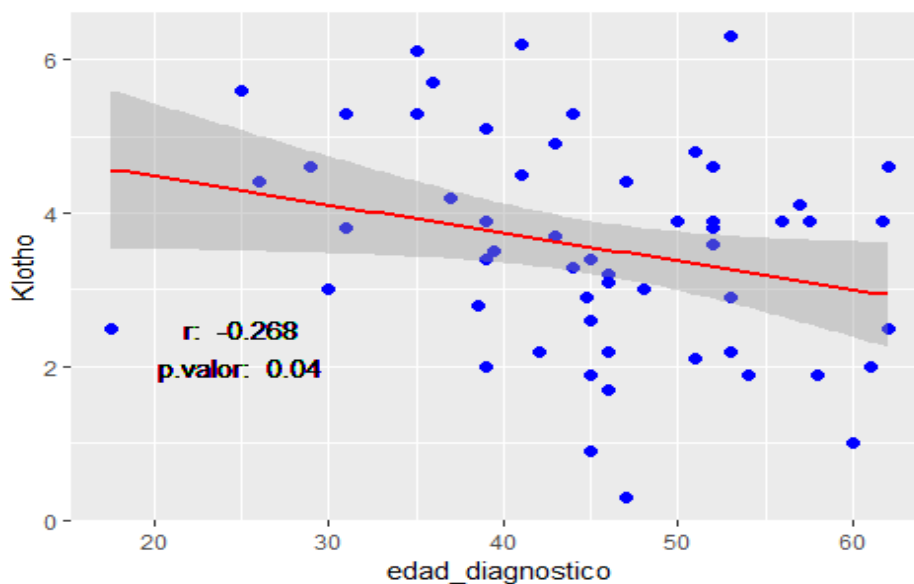
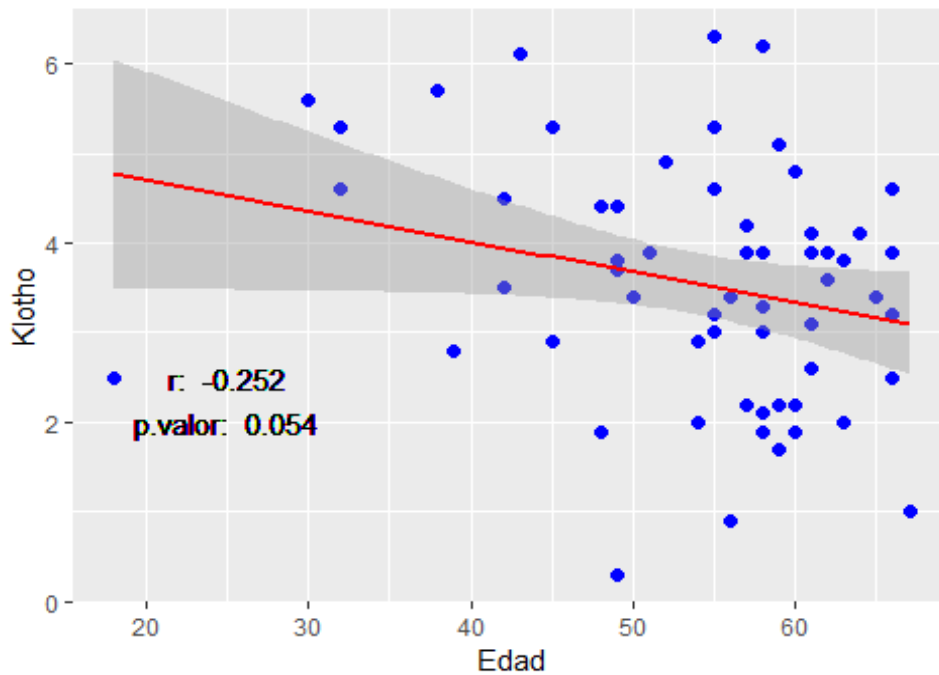


Tabla 22. Análisis multivariante de edad al diagnóstico y Klotho.				
	Coeficiente	IC -	IC +	P valor
Edad diagnostico	-0,041	-0,078	-0,003	0,034
IMC	0,582	-0,123	1,286	0,103
Duración de la enf	-0,015	-0,069	0,039	0,579
tabaco	0.227	-0,720	1.173	0,632

2.2.2. Correlación entre los niveles de Klotho y los factores de riesgo cardiovascular en los pacientes con esclerosis sistémica.

Si analizamos las correlaciones de Klotho con el resto de variables, se observa que Klotho se relaciona significativamente con las siguientes: Edad, Peso, VOP, PropNterminal. Eliminando la variable Edad, la variable más significativa es el perímetro abdominal. Se observa una correlación **negativa** con la edad, el peso, perímetro abdominal, el propéptido N terminal y la VOP (cuando una aumenta, la otra disminuye) y una correlación **positiva** con la edad, de forma que crecen conjuntamente.

Figura 20. Correlación entre la edad y niveles de Klotho en las pacientes con ES.



Tras realizar ajuste por las variables edad, tabaco, IMC y FG hay mucha variación respecto a las correlaciones previas, de forma que encontramos diferencias únicamente en la variable de resistencia vascular periférica (*Tabla 23*), siendo esta relación negativa de forma que, a menos resistencias vasculares periféricas, los niveles de Klotho están más elevados.

Tabla 23. Correlaciones entre Klotho y FRCV de ES.		
	Coeficiente de correlación	P valor
RVP	-1,54	0,07

2.2.3 Correlación entre los niveles de Klotho, masa ósea y factores de riesgo de osteoporosis en los pacientes con esclerosis sistémica.

En el estudio de posibles correlaciones entre el metabolismo óseo de las pacientes y Klotho, únicamente encontramos los hallazgos que se muestran en la *Tabla 24*, de forma que existiría una correlación negativa entre el T-score y Z-score de columna lumbar y los niveles de Klotho en pacientes con ES.

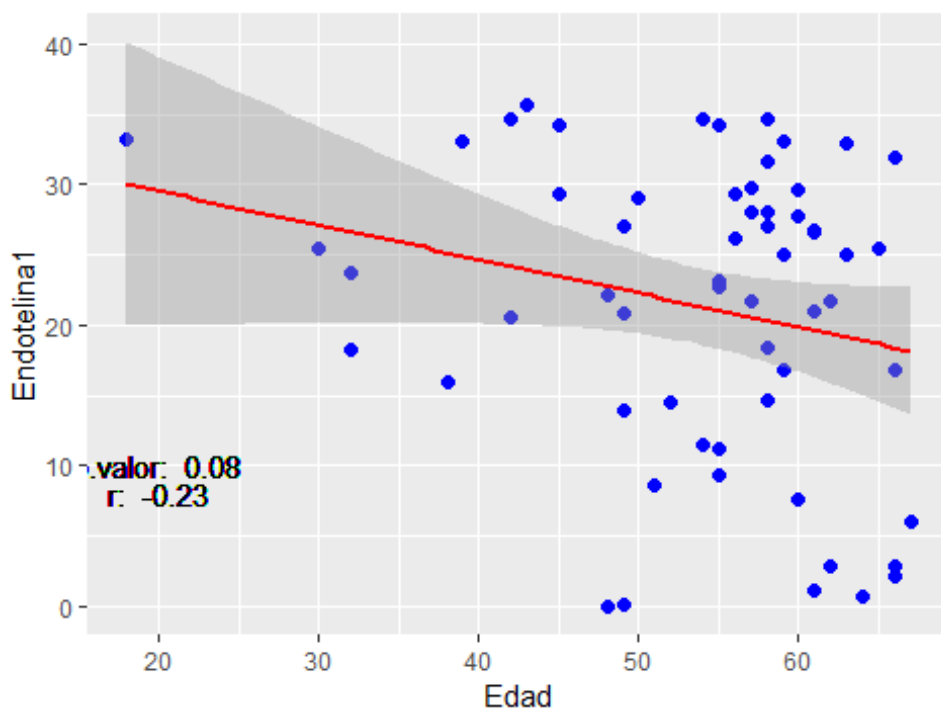
Tabla 24. Correlaciones entre Klotho y estudio óseo en ES.		
	Coeficiente de correlación	P valor
DMO lumbar (T-Score)	-0,37	0,04
DMO lumbar (Z-Score)	-0,35	0,07

2.3 Estudio de endotelina-1 y su correlación con las características de la enfermedad, factores de riesgo cardiovascular y metabolismo óseo.

No se ha encontrado ninguna correlación significativa entre las características de la enfermedad y los niveles de endotelina-1.

La *Tabla 25* muestra los coeficientes de correlación entre ET-1, los factores de riesgo cardiovascular y otras variables en pacientes con ES. Los niveles séricos de ET-1 mostraron una correlación positiva estadísticamente significativa con VOP ($r=0,26$, $p=0,04$). Sin embargo, no hubo correlación de los niveles de ET-1 con la edad (*Figura 21*), el IMC, la circunferencia de la cintura, la duración de la enfermedad o el tabaquismo.

Figura 21. Correlación entre niveles de ET-1 y edad de las pacientes con ES.



En cuanto a las correlaciones destacables observamos que existe correlación significativa en parámetros analíticos como la glucosa y las enzimas hepáticas GOT, GGT y FA. Por otro lado, y en cuanto a riesgo cardiovascular, observamos una correlación negativa con la FC, con la masa del VI y con el diámetro del septo. En el modelo de regresión lineal, se observó también una correlación positiva de forma que las concentraciones más altas de ET-1 se asociaron con una VOP más alta [$\beta=0,03$ IC del 95% (0,001, 0,060); $p=0,04$].

Tabla 25. Correlaciones entre ET-1 y resto de variables en pacientes con ES.		
	Coefficiente de correlación	P valor
Edad	-0,23	0,079

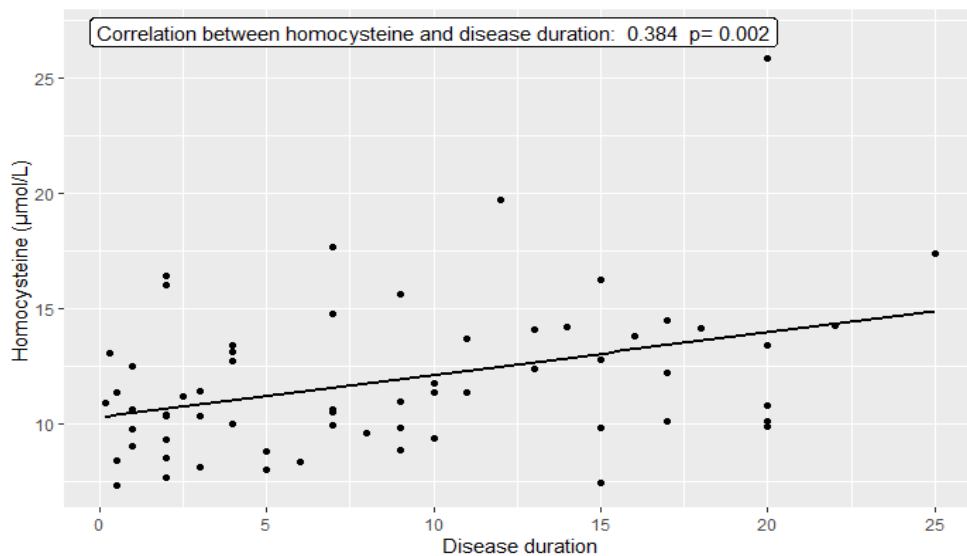
Talla	0,22	0,088
Peso	-0,01	0,927
IMC	-0,11	0,413
Perímetro abdominal.	-0,18	0,175
Hipertensión	-0,18	0,177
Tabaco	0,01	0,983
Duración de la enfermedad	-0,20	0,138
Dosis de prednisona	-0,03	0,690
Tratamiento con Bosentán	-0,12	0,173
PCR	-0,01	0,969
VSG	-0,15	0,260
Glucosa	-0,37	0,003
GOT	-0,25	0,059
GGT	-0,27	0,037
FA	-0,25	0,060
Colesterol	- 0,09	0,497
LDL	- 0,08	0,542
HDL	- 0,09	0,502
Triglicéridos	- 0,20	0,129
Ácido Úrico	-0,09	0,481
BNP	0,05	0,724
VOP	0,26	0,047
FC	-0,31	0,019
Masa VI	-0,28	0,075
Diasepto	-0,29	0,036

En el estudio de regresión múltiple, se obtuvieron los resultados que se presentan en la *Tabla 26*. Podemos afirmar que la glucosa se relaciona con el ET-1, siendo finalmente el único hallazgo significativo, independientemente del valor de los resultados del resto de las variables.

2.4 Estudio de homocisteína y su correlación con las características de la enfermedad, factores de riesgo cardiovascular y metabolismo óseo.

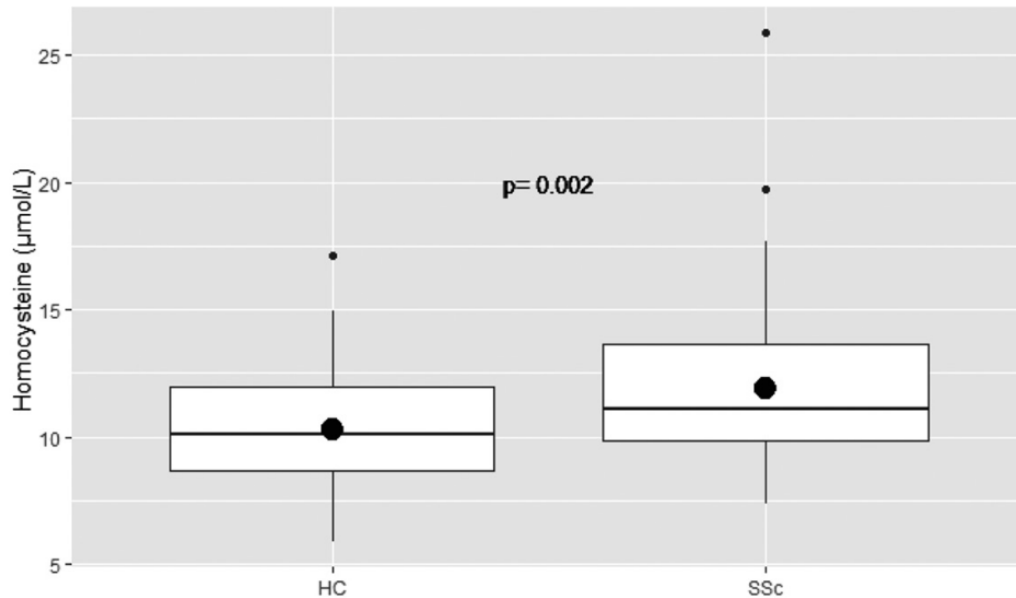
En cuanto a las características de la enfermedad, el único resultado significativo a destacar es la correlación con la variable duración de la enfermedad (*Figura 22*).

Figura 22. Correlación entre niveles de homocisteína y duración de la enfermedad.



Los niveles séricos de homocisteína, que recordemos se encuentran más elevados en las pacientes que en los controles de forma significativa (*Figura 23*).

Figura 23. Niveles de homocisteína en controles y pacientes con ES.



Se ha observado una asociación entre los niveles de homocisteína y factores de riesgo cardiovascular en las pacientes con ES. La *Tabla 27* muestra los coeficientes de correlación entre homocisteína y varios marcadores en pacientes con ES, donde destaca una correlación estadísticamente significativa con la variable VOP ($r=0.28$, $p=0,02$), BNP ($r=0,36$, $p=0,004$).

Tabla 27. Correlaciones entre homocisteína y resto de variables en pacientes con ES.

	Coefficiente de correlación	P valor
Edad	0,24	0,054
Talla	-0,07	0,614
Peso	0,04	0,745
IMC	0,08	0,559
Perímetro abdominal	0,04	0,764
Hipertensión arterial	0,08	0,543

Tabaco	0,17	0,189
Duración de la enfermedad	0,38	0,002
VOP	0,28	0,027
Dosis de prednisona	-0,03	0,690
Tratamiento con metotrexato	-0,08	0,374
PCR	0,18	0,155
VSG	0,05	0,721
Creatinina	0,38	0,002
Urea	0,35	0,005
Filtrado glomerular	-0,30	0,007
Colesterol	0,14	0,283
LDL	0,11	0,414
HDL	- 0,06	0,622
Triglicéridos	0,20	0,116
Ácido úrico	0,19	0,146
BNP	0,36	0,004

Sin embargo, respecto a otros factores de riesgo cardiovascular, aunque hay correlación con la variable edad, no hubo correlación de niveles de homocisteína con el IMC, la circunferencia de la cintura o el tabaquismo. En el modelo de regresión lineal, las concentraciones de homocisteína y se asociaron con mayor VOP [$\beta=0.74$ IC 95% (0,085, 1,394); $p=0,027$], BNP [$\beta=0,04$ IC del 95 % (0,014; 0,072); $p=0,004$] y duración de la enfermedad [$\beta=0.18$ IC 95% (0,070, 0,300); $p=0,002$] como se observa en las *Figuras 24 y 25*.

Figura 24. Correlación entre niveles de homocisteína y BNP.

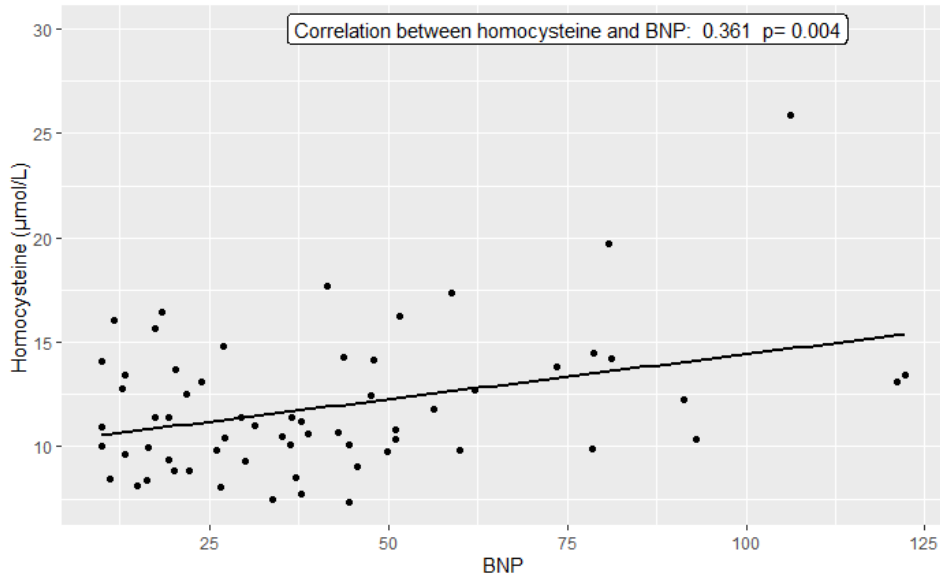
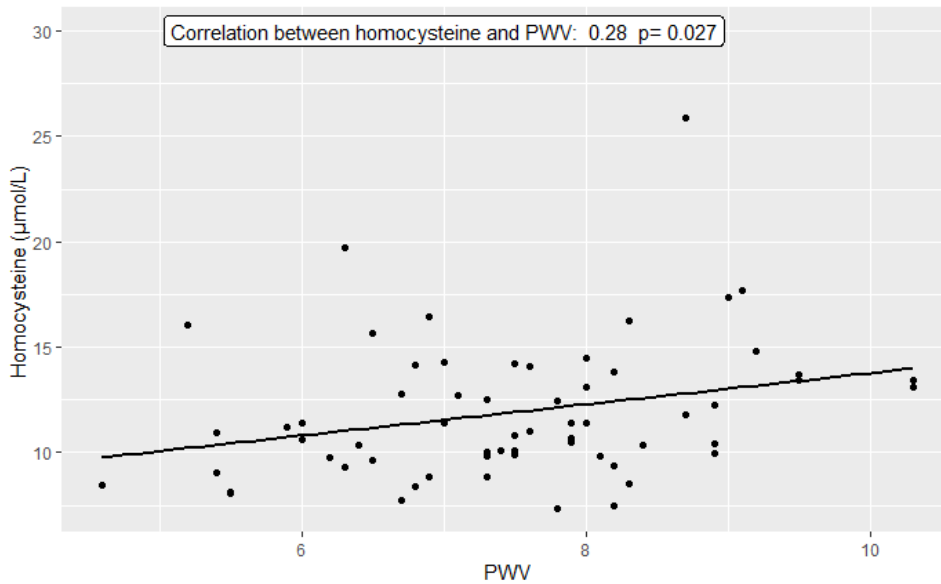


Figura 25. Correlación entre niveles de homocisteína y VOP.



El análisis de regresión lineal múltiple (*Tabla 28*) muestra la posible influencia de la edad, IMC, tabaquismo actual, presión arterial, homocisteína, HDL y glucosa niveles en la predicción de VOP. Afirmamos de esta forma que la VOP se relaciona de forma independiente con la edad, la hipertensión, la homocisteína, los niveles de HDL y la glucosa.

Tabla 28. Regresión múltiple de VOP con FRCV en pacientes con ES.			
	Coeficiente	IC -	P valor
Edad	0,045	(0,02, 0,07)	0,001
Tabaco	0,001	(-0,004, 0,007)	0,614
IMC	0,062	(0,03, 0,16)	0,214
Hipertensión	0,040	(0,008)	0,036
Homocisteína	0,033	(0,003, 0,062)	0,031
HDL	-0,051	(-0,105, 0,043)	0,023
Glucosa	0,004	(0, 0,007)	0,035

VII.DISCUSIÓN

La esclerosis sistémica es una enfermedad autoinmune sistémica, con afectación multiorgánica, cuya causa es desconocida. Para comprender mejor la fisiopatología de esta enfermedad se está estudiando numerosos factores y moléculas que puedan explicar la etiología de esta enfermedad. Es bien conocida la afectación vascular y del endotelio que sufren estas pacientes, cuyas manifestaciones clínicas principales son el fenómeno de Raynaud, las úlceras digitales y las calcificaciones de tejidos blandos que podrían estar en relación con

una función anómala de los fibroblastos y una disregulación de las moléculas que participan en su funcionamiento.

En nuestro estudio hemos medido FGF-23, Klotho y Endotelina-1 en las pacientes comparando los niveles con un grupo control para ver si hay diferencias y correlaciones con las manifestaciones clínicas de las pacientes. A continuación, se describe por apartados la discusión acerca de los hallazgos encontrados en nuestro estudio.

1. Análisis de las diferencias entre pacientes con esclerosis sistémica y controles.

Desde un punto de vista demográfico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes con ES y los controles al analizar la edad o la raza. En las características antropométricas de las pacientes tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas, por lo que ambas poblaciones eran similares.

Al analizar los antecedentes personales de interés cardiovascular entre ambos grupos se detectó una mayor frecuencia de fumadoras en el grupo control (17,7% vs 24,2%, $p=0.04$). Dado que este factor podría influir en el análisis de los resultados, se ajustó por las variables que podría ser factor de confusión, por edad, tabaco, CKD-EPI e IMC. Realizamos además una división de ambos grupos a estudio en fumadores y no fumadores, para el análisis de las variables, y se realizó la medición de FGF-23, Klotho y ET-1 sin encontrar diferencias significativas.

Tampoco encontramos diferencias entre sujetos y controles en el resto de factores de riesgo cardiovascular, tal y como se ha mostrado en numerosas series (32) (58).

En cuanto al tratamiento crónico de ambos grupos, sí hubo un mayor consumo específicamente de calcioantagonistas en las pacientes con ES respecto al grupo control (32,2% vs 1%, $p < 0.001$), prescritos en las pacientes por ser parte del tratamiento del fenómeno de Raynaud, presente en el 100% de las pacientes de nuestro estudio. El porcentaje de pacientes tratadas con calcioantagonistas descrito es similar al de otros estudios publicados (12).

No se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos de nuestro estudio al analizar la frecuencia de dislipemia mixta, hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia aisladas. Sin embargo, las pacientes con ES tuvieron en el análisis realizado durante el estudio diferencias en el perfil lipídico con un HDL significativamente menor ($58,7 \pm 15,5 \text{ mg/dL}$ vs $63,3 \pm 13,1 \text{ mg/dL}$, $p = 0.03$). Estos datos son similares a los encontrados en numerosos estudios (48)(49)(31)(58). En contraposición en el estudio de Ho et al (32), los niveles de HDL fueron similares en ambos grupos, lo cual puede deberse a las diferencias entre poblaciones estudiadas.

En la exploración física, no se encontraron diferencias en las cifras de TAS ni TAD, pero sí se observó que los pacientes con ES presentaron una tendencia a tener mayor FC que el grupo control ($71,7 \text{ lpm}$ vs $68,1 \text{ lpm}$, $p = 0.09$), medida en ECG. Además, observamos que el intervalo QT corregido de las pacientes fue superior respecto al grupo control ($423,3 \text{ ms} \pm 23,3 \text{ ms}$ vs $409,5 \text{ ms} \pm 20,1 \text{ ms}$, $p = 0,001$). En estudios previos se ha comprobado cómo en pacientes con ES existe

una disfunción autonómica expresada a nivel cardiovascular en una menor variabilidad de la FC, así como un aumento del ritmo cardiaco en respuesta a estímulos (96)(97)(98). Además, el QTc prolongado en pacientes con esclerosis sistémica se ha relacionado con la fibrosis miocárdica intersticial y la disfunción autonómica (99). Estos hallazgos creemos que son de gran interés y justificarían un estudio longitudinal posterior en el que se analizara el valor del QTc como predictor de afectación miocárdica.

La ES suele asociarse a un menor grado de inflamación sistémica que otras enfermedades como el LES o la AR, motivo por el cual los reactantes de fase aguda clásicos no suelen elevarse hasta valores muy patológicos. No obstante, sí que se ha descrito con anterioridad y comprobamos en nuestra serie cómo la VSG fue significativamente superior en los pacientes con ES que en controles ($21,1 \pm 16$ mm vs $11,3 \pm 10,2$ mm, $p = 0.007$) (33). Los valores de PCR también fueron significativamente superiores en pacientes con ES ($0,4 \pm 0,4$ vs $0,2 \pm 0,1$ con $p < 0,001$) (100). Estos hallazgos sugieren que en la ES existe un cierto grado de inflamación en posible relación con algunas de las manifestaciones clínicas encontradas en los enfermos. Recientemente se ha sugerido, en el caso de la enfermedad intersticial pulmonar, que los pacientes con parámetros inflamatorios evidentes, serían candidatos a un tratamiento inmunodepresor (101).

Tal y como hemos comentado con anterioridad, la homocisteína es un FRCV emergente de origen inflamatorio y de interés creciente en distintos grupos poblacionales por su importante papel en el desarrollo de la placa de ateroma. En nuestra serie los pacientes con ES presentaban niveles más elevados de homocisteína que el grupo control ($11,9 \pm 3,3$ $\mu\text{mol/L}$ vs $10,3 \pm 2,3$ $\mu\text{mol/L}$,

p=0.002). Este hallazgo, ya está descrito previamente en numerosos estudios (37), por lo que es posible que el control de los niveles de homocisteína pudiera tener interés en la práctica clínica con el fin de prevenir los eventos cardiovasculares.

La evaluación del nivel de péptido natriurético cerebral (BNP) se ha convertido en un indicador importante y bien reconocido del riesgo cardiovascular en la ES. El BNP juega un papel clave en la adaptación multiorgánica y celular en la insuficiencia cardíaca, independientemente de la lesión inicial. Estudios recientes han demostrado que BNP puede ser un marcador de diagnóstico sensible, específico y pronóstico (102) en pacientes con ES con HAP establecida y también puede ser útil para la identificación de disfunción cardíaca primaria (103).

En el estudio de Avouac et al (102), el BNP tuvo un alto valor predictivo negativo para la HTP precapilar (92%) y detectaron que está aumentado incluso en pacientes con ES libres de factores de riesgo cardiovascular. Se trata de un biomarcador de fácil obtención pueden ser útiles para la evaluación y estratificación sistemáticas de los pacientes con ES especialmente para identificar a aquellos con riesgo de hipertensión pulmonar.

En este sentido, en nuestro estudio hemos encontrado niveles más altos de BNP en pacientes con ES en comparación con controles sanos ($79,8 \pm 54,8$ pg/ml vs $59,7 \pm 38,4$ pg/ml, $p=0.01$), coincidiendo con la mayoría de estudios, como el de Elshamy et al (104), donde informaron un aumento significativo en los valores medios de los niveles séricos de BNP en pacientes con ES. Así pues, nuestros datos confirman que la monitorización de los niveles de BNP puede ser de utilidad en el seguimiento de los pacientes con ES.

La VOP es un marcador de rigidez arterial que tiene importancia pronóstica en diversas afecciones vasculares, como la hipertensión sistémica, insuficiencia renal e insuficiencia cardíaca. El índice de aumento estandarizado a una frecuencia cardíaca de 75/minuto (AIx_{75}), se define como la amplitud de la onda reflejada desde la periferia hasta el corazón (57). La implicación fundamental de la mayoría de nuestras variables a estudio, se traduce en valorar la existencia o no de una mayor prevalencia de aterosclerosis subclínica en los pacientes con ES, intentando detectarla mediante el estudio de la VOP. Ya hemos descrito previamente los distintos estudios publicados que han descrito la existencia de una mayor prevalencia de aterosclerosis, cuantificada mediante diferentes métodos, en pacientes con ES respecto a la población general. Sin embargo, son escasos los que valoran la aterosclerosis precoz mediante VOP. En nuestro estudio obtuvimos una VOP similar en ES y en controles, y tampoco encontramos diferencias en el resto de parámetros medidos. Bartoloni et al (105), observaron que los pacientes y los controles no diferían en la velocidad de la onda del pulso carótido-femoral o carotídeo-radial, pero si detectaron que el AIx_{75} fue mayor en mujeres con ES y que la amplificación de la presión del pulso central a braquial fue significativamente menor en pacientes con ES. En este estudio, la ES fue un predictor independiente de AIx_{75} y la amplificación de la presión del pulso. En contraposición a nuestros resultados, en el estudio de Liu et al, también encontraron que la VOP medida en brazo y antebrazo eran mayores en las pacientes de forma significativa respecto a los controles (106). Igual ocurre en el estudio de Timar et al, donde las VOP elevadas respecto a los controles también fueron significativas en miembros superiores, en brazo y antebrazo pero no en el resto de arterias (107). Los pacientes con úlceras digitales tuvieron un aumento de

Alx75 en comparación con los pacientes sin úlceras digitales, mientras que no hubo diferencia en la VOP. Los resultados de la regresión logística multivariante revelaron que la edad, el sexo, la velocidad de sedimentación globular, la presión del pulso aórtico y las úlceras digitales se asociaron de forma independiente con el Alx75 (108). Las diferencias encontradas podrían deberse a diferencias en las poblaciones analizadas. La nuestra podríamos decir que se trataba de una cohorte con pocas manifestaciones graves de la enfermedad y una evolución de la misma relativamente corta, lo que pudiera justificar los hallazgos encontrados.

Muchos grupos de trabajo han intentado valorar cardiopatías en pacientes con ES mediante ecocardiografía. En nuestras pacientes hemos encontrado diferencias significativas respecto a algunos de los parámetros medidos por ecocardiografía. Por un lado, las pacientes presentan una FEVI más baja ($62,1 \pm 3,9$ vs $63,3 \pm 13,1$ con $p=0,03$). El diámetro de la aurícula derecha es mayor ($33,8 \pm 6,9$ vs $32,5 \pm 3,8$ con $p=0,07$), coincidiendo en este caso con otros artículos (12), donde se han detectado diámetros mayores lo que podría participar en la aparición de arritmias supraventriculares. La masa del VI ($107,9 \pm 34,9$ vs $92 \pm 29,2$, $p= 0,01$), también ha resultado significativamente mayor en las pacientes respecto al grupo control (109), así como el grosor de la pared posterior del VI ($8,1 \pm 1,3$ vs $7,5 \pm 1,4$, $p=0,05$). En un estudio publicado obtuvieron resultados similares donde el grosor de la pared interventricular, el grosor relativo de la pared y el índice de masa del VI, así como el índice de volumen de la aurícula izquierda, fueron mayores en el grupo ES que en los controles (110).

En cuanto al estudio de flujo doppler encontramos diferencias significativas en la medición de la onda E, ($0,8 \pm 0,2$ vs $1,1 \pm 0,4$, $p=0,01$), de forma que se encuentra

más elevada en las pacientes. Este dato se relaciona de forma indirecta con la disfunción diastólica, y siendo predictor de la misma se ha relacionado este parámetro de forma independiente con la muerte, tras un seguimiento medio de $1,9 \pm 1,3$ años (111). En el resto de parámetros descrito, incluido la PAPs estimada no encontramos diferencias significativas.

Habitualmente, en el seguimiento de las pacientes con ES se suele realizar una ecocardiografía anual. A partir de estos hallazgos, se podría sugerir hacer un seguimiento específico de estos parámetros como posibles indicadores del desarrollo de afectación miocárdica, aunque se necesitarían estudios con muestras más grandes para poder protocolizar dicho seguimiento.

Finalmente, valoraremos los resultados del metabolismo óseo. Al analizar los niveles séricos de vitamina D, detectamos deficiencia de la misma tanto en pacientes (65)(64) como en controles (26 ± 12 vs $23,1 \pm 7,3$, $p=0,32$) pero no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, las pacientes con ES tomaban con mayor frecuencia que los controles suplementos de vitamina D y calcio, asociados o no a bifosfonatos, lo que podría estar influyendo significativamente en los resultados.

Continuando con el estudio analítico encontramos diferencias significativas en los niveles de PTH ($50,7 \pm 27,3$ vs $54,9 \pm 19,6$ $p= 0,02$), ($3,6 \pm 0,5$ vs $3,4 \pm 0,5$, $p=0,04$) y fosfato ($9,5 \pm 0,3$ vs $9,4 \pm 0,4$, $p=0,05$). En la mayoría de los estudios sobre osteoporosis en ES no se han encontrado diferencias en PTH, calcio ni fósforo (112). El aumento de PTH únicamente se ha descrito en ES en pacientes con calcinosis y calcifilaxis, como consecuencia de hiperparatiroidismo secundario a

niveles bajos de calcio y déficit de vitamina D, por probable malabsorción intestinal (113). En el estudio de Atteritano (114), observaron una correlación negativa entre los niveles de vitamina D y los niveles de PTH.

En cuanto a los datos obtenidos de la densitometría tampoco encontramos diferencias entre ambos grupos, al contrario que ocurre en otros estudios donde sí se detecto disminución de masa ósea (63)(60)(112), pero sí encontramos un porcentaje mayor de fracturas por fragilidad en las pacientes (6% vs 2%, $p=0,04$), coincidiendo con algunos metanálisis (59).

Es bien conocido que el consumo crónico o episódico de esteroides favorece la pérdida de masa ósea. En nuestras pacientes encontramos que solo 5 de las pacientes tomaba prednisona y a dosis bajas y la mayoría estaban en tratamiento con calcio y vitamina D, lo que puede haber influido en nuestros resultados.

2. Análisis de las diferencias entre subtipos de esclerosis sistémica.

Al subdividir el grupo de pacientes por subtipo de enfermedad, lo primero que destaca es la proporción de los mismos, de forma que en nuestro grupo de pacientes el más numeroso es la ESD siendo el 50% de las pacientes incluidas, el 39% corresponde a ESL y el 11% a ESse. En la mayoría de los estudios en el grupo de pacientes predomina la variante ESL en torno a un 60% y un 40% corresponde a ESD (111). Desconocemos la causa de dichos porcentajes en nuestro estudio.

No encontramos diferencias significativas en cuanto los parámetros del estudio de rigidez arterial entre los subtipos de enfermedad, sin embargo, en otros

estudios han encontrado diferencias. En concreto en el estudio de Colaci et al (115), encontraron una VOP más elevada en pacientes con ESL y en pacientes con anticuerpos anticentrómero. En cuanto a la ecocardiografía por subtipos de enfermedad, no encontramos diferencias entre parámetros de las diferentes subclases lo que coincide con otras series publicadas (40)(116).

Profundizando en el metabolismo y función ósea por subtipos, no encontramos diferencias en cuanto a parámetros analíticos del metabolismo óseo, ni diferencias en riesgo de fractura, similar a lo encontrado otros estudios (117). Algunos estudios han encontrado diferencias, siendo los niveles de vitamina D inferiores en ESD respecto a ESL. Además en el estudio de Corrado et al, en el grupo de ESD, la DMO en la columna, cuello femoral y cadera total fue significativamente menor en comparación con ESL(112). En nuestro caso, hemos detectado diferencias significativas en las pacientes con la variante ESse, donde tanto la T-score como la Z-score a nivel vertebral de la densitometría se encuentran aumentadas. Revisando bibliografía no encontramos en la literatura hallazgos similares. Puede que no hallamos encontrado más diferencias frente a otros estudios, porque en nuestro caso la mayoría de las pacientes, tenían realizada densitometría y la mayoría estaban en tratamiento.

3. Estudio de FGF-23.

3.1 FGF-23 y manifestaciones de la enfermedad.

No hemos encontrado una diferencia significativa en los niveles de FGF-23 entre pacientes con ES y controles sanos en nuestro estudio, lo que concuerda con el

estudio de Ahmadi et al (117). En el estudio de Shenavandeh et al (118), en un estudio en Irán, tampoco encontraron diferencia entre los niveles de FGF-23 de sus pacientes con ES y controles sanos, y cuando analizaron la existencia de diferencias en los niveles séricos de FGF-23 entre pacientes con o enfermedad localizada, tampoco encontraron diferencias significativas. En relación con estos datos, en nuestro estudio tampoco hemos observado diferencias en los niveles de FGF-23 entre pacientes y controles, así como entre los diferentes subtipos de esclerosis sistémica.

En la ES podemos encontrar la presencia de calcinosis en ambos subtipos de la enfermedad. En nuestro estudio, encontramos niveles séricos de FGF-23 significativamente elevados en pacientes con ES con calcinosis en comparación con pacientes con ES sin calcinosis, lo cual no estaba descrito previamente. La relación entre los niveles de FGF-23 y calcinosis no está demostrada, pero algunos estudios han encontrado correlación en pacientes con enfermedad renal crónica (119). Este dato debe ser objeto de estudios posteriores.

FGF-23, se une específicamente a las células renales que expresan el receptor-1 de FGF, lo que conduce a la disminución de la síntesis de la hormona activa de la vitamina D, la 1,25 (OH) 2 D3, al causar la represión del gen de la α -1 hidroxilasa, regulando así la homeostasis del calcio. Normalmente, el FGF-23 también inhibe la reabsorción tubular renal de fosfato al disminuir la expresión génica de los transportadores de fosfato dependientes de Na⁺ (Na/Pi-2a y Na/pi-2c) en los túbulos contorneados proximales. Otra función del FGF-23 es disminuir la transcripción del ARNm de la hormona paratiroidea e inhibir su secreción (120). Dado que FGF-23 es un regulador conocido de los tres factores, es plausible que

FGF-23 pueda estar implicado en el mecanismo de calcificación vascular y de tejidos blandos.

3.2 FGF-23 y riesgo vascular.

A nivel cardiaco, FGF-23 actúa directamente sobre el miocito (sin precisar la presencia de Klotho) a través de la vía de señalización del factor nuclear de activación de las células T (NFAT)-calcineurina, iniciado por la activación del FGFR-4 (121), induciendo hipertrofia cardiaca y otros cambios en el remodelado cardiaco, como son la fibrosis cardiaca, debida al aumento de expresión de TGF- β en los fibroblastos cardiacos, a través de la vía de la β -catenina y la alteración del metabolismo cardiaco, resultando en una reducción de la función cardiaca. Por otra parte, FGF-23 puede incrementar el calcio intracelular en los cardiomiocitos, incrementando la contractilidad cardiaca, pudiendo contribuir a un aumento del riesgo de arritmias (122).

Además, diferentes estudios han reportado una asociación positiva entre los niveles de FGF-23 circulante y rigidez arterial (123), aterosclerosis (124), calcificación coronaria (125) y aterosclerosis carotídea (126) en sujetos sanos.

En nuestro estudio encontramos asociación positiva entre los niveles de FGF-23, y la talla, el peso y el perímetro abdominal. Estudios previos han relacionado FGF-23 con los factores de riesgo CV tradicionales, incluyendo el tabaco, obesidad, dislipemia y síndrome metabólico (127). En el estudio de Zaheer et al (128), FGF23 se asoció con un aumento del IMC, la circunferencia de la cintura y la relación cintura-cadera y la masa grasa corporal total.

En cuanto a los parámetros hemodinámicos, en nuestro estudio hemos encontrado correlación entre FGF-23 y la TAD, la tensión de aumento y la FC. Una posible explicación a estos resultados podría ser el hecho de que FGF-23 puede incrementar la presión arterial (129), debido al incremento en la retención de sodio y a la activación del sistema renina-angiotensina.

En cuanto al resto de parámetros analíticos encontramos una correlación positiva con la PCR en las pacientes. Ya se ha descrito previamente la asociación de mayor de niveles de FGF-23 con aumento de moléculas inflamatorias como la PCR, TNF- α y el fibrinógeno (130). Incluso en pacientes con artritis reumatoide se ha descrito en una correlación positiva entre la VSG y PCR con FGF-23 (131). También encontramos una tendencia a una correlación positiva con el ácido úrico, y es que se ha descrito una relación independiente entre los niveles de urato y FGF-23 en pacientes con ERC (132).

Además, encontramos una relación inversa estadísticamente significativa entre las mediciones de FGF-23 y HDL, de forma que a mayor valor de FGF-23, menores niveles de HDL, que fue independiente de la edad. Mirza et al (127) examinaron la asociación entre las concentraciones de FGF-23 y los marcadores del síndrome metabólico en dos cohortes de pacientes caucásicos predominantemente mayores del estudio Osteoporotic Fractures in Men Study (MrOS) y Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS). Se encontraron niveles más bajos de HDL y apoA1 en suero, junto con niveles más altos de triglicéridos entre los pacientes con mediciones más altas de FGF-23. Montford et al (133) también observaron una asociación inversa significativa entre las concentraciones de FGF-23 y HDL en pacientes en diálisis que persistió tras el análisis multivariante.

Actualmente hay escasez de evidencia para apoyar un mecanismo bioquímico por el cual FGF-23 podría controlar la regulación de lípidos. Una teoría atractiva es que FGF-23 puede emitir señales a través de múltiples receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), que antes se creía limitados a otros miembros de la subfamilia FGF19. De hecho, FGF-23 está estrechamente relacionado en homología estructural tanto con FGF15/19 como con FGF21 (134). La señalización de FGF-15/19 está implicada principalmente en el metabolismo de los ácidos biliares y el llenado de la vesícula biliar, mientras que los datos experimentales respaldan el papel de FGF21 en la regulación de la lipólisis.

En el estudio de la cardiopatía en ES, decidimos realizar ecocardiografía doppler, ya que pueden detectar defectos en la función miocárdica en etapas asintomáticas (27). Schattke et al (135) indicaron que el Doppler tisular es una herramienta útil para detectar el deterioro sistólico del ventrículo derecho temprano en pacientes con ES con o sin hipertensión pulmonar. En nuestro estudio detectamos una correlación positiva entre los niveles de FGF-23 y el diámetro sistólico del ventrículo izquierdo y una correlación negativa con el grosor de la pared posterior del VI. En el artículo de Ky et al (136), identificaron interacciones significativas entre la vitamina D y FGF-23 en la remodelación cardíaca. Se observó aumento de la masa del VI y aumento del volumen telediastólico con niveles bajos de vitamina D y niveles altos de FGF23. Al contrario que en numerosos estudios no hemos encontrado correlación entre FGF-23 y la FEVI y la masa del VI (73). Nuestros hallazgos creemos que abren una vía de investigación en el campo de la afectación miocárdica en la ES.

3.3 FGF-23 y metabolismo óseo.

La prevalencia de osteoporosis en la ES es del 25%, similar a la encontrada en otras enfermedades autoinmunes como la AR, pero la densitometría está menos extendida en la ES, y el IMC es más bajo que en AR (137). Se han postulado gran variedad de causas que podrían participar en este incremento de osteoporosis, como la inflamación crónica, la malabsorción, insuficiencia renal, consumo de corticoides, movilización del calcio óseo, alteraciones del metabolismo fosfocálcico como parte del proceso de la calcinosis (61).

En nuestro estudio la prevalencia de osteoporosis es del 21%, similar a los descritos en la literatura y no encontramos diferencias en los valores de IMC respecto a los controles sanos (114)(138). Aunque está comprobado una asociación entre IMC y baja densidad ósea, en nuestro estudio no encontramos diferencias en el IMC respecto a los controles, lo cual puede ser la causa de que no encontremos diferencias entre ambos grupos respecto a la densidad ósea (139)(140). No hemos encontrado diferencias entre ambos grupos de los principales marcadores de remodelado óseo, como la osteocalcina, el propéptido aminoterminal del colágeno tipo 1 y el telopéptido C terminal, de acuerdo a lo observado en otros estudios publicados.

La relación entre FGF-23 y BMD ha sido explorada por varios estudios observacionales. Coulson et al (141), no encontraron una asociación significativa entre el FGF-23 y la DMO de cuerpo entero en los sujetos de su estudio, independientemente de la edad. El nivel de FGF-23 fue similar entre sujetos jóvenes (18-30 años) y ancianos (69-81 años) en su estudio. Un estudio prospectivo

realizado en la población anciana de entre 70 y 79 años en los Estados Unidos de América tampoco mostró una asociación significativa entre los niveles de FGF-23 y los cambios porcentuales anuales en la DMO total del área de la cadera después de ajustar por datos demográficos, IMC y TFG (142).

Tampoco encontramos una asociación significativa entre los niveles séricos de FGF-23 y la DMO tanto en la cadera como en la columna.

El índice FRAX es un instrumento en línea que ha sido ampliamente utilizado para la evaluación del riesgo de fractura por muchas organizaciones profesionales (143). FRAX emplea factores de riesgo clínico como edad, IMC, fracturas previas y otros factores solos o combinados con la DMO del cuello femoral determinada por DMO para estimar la probabilidad de 10 años de MOF e HF (144). En nuestro estudio, encontramos que los niveles de FGF-23 de las pacientes, están positivamente correlacionados con la probabilidad de fractura osteoporótica grave y de cadera en 10 años.

A pesar de la falta de una relación entre FGF-23 y DMO, algunos estudios informaron una asociación significativa entre los niveles de FGF-23 y el riesgo de una fractura osteoporótica. Mirza et al (109), informaron una asociación significativa entre niveles más altos de FGF-23 y un mayor riesgo de fracturas vertebrales, pero no fracturas no vertebrales entre 2868 hombres ancianos suecos. Los riesgos de fractura fueron mayores cuando los niveles de FGF-23 fueron más de 55,7 pg/ml (109). De manera similar, un estudio en la población japonesa con enfermedad renal crónica temprana informó que un nivel de FGF-23 de 56,8 pg/ml era el punto de corte óptimo para la predicción de fracturas

vertebrales (145). Ramli et al (146), revisan la aplicación potencial de FGF-23 en la predicción de osteoporosis y fracturas, y encontraron que la evidencia hasta ahora apoya al FGF-23 como un predictor de fracturas osteoporóticas. En algunos estudios ya se ha relacionado niveles elevados de FGF-23 con el riesgo de fractura, de forma que se está postulando como posible biomarcador de fractura osteoporótica.

4. Estudio de Klotho.

4.1 Klotho y características de la enfermedad.

Kuro-o et al (77) identificaron α -Klotho en 1997 como un nuevo gen antienvjecimiento, que codificaba dos tipos de proteínas. Una es la forma unida a membrana (mKlotho), que se expresa en la superficie celular. El dominio extracelular de mKlotho puede ser escindido por proteasas y liberado al torrente circulatorio, esta parte es definida como soluble Klotho (sKlotho). mKlotho y sKlotho poseen funciones biológicas distintas (147). mKlotho forma un complejo con FGFR y sirve como correceptor del FGF-23 para mantener la homeostasis mineral (148) . sKlotho se puede detectar en la circulación por ELISA y se piensa que es la forma activa principal, ejerce efectos beneficiosos pleiotrópicos actuando como una hormona circulatoria y protege a las células contra el estrés oxidativo, hipoxia y la inflamación, también inhibe la apoptosis celular y la fibrosis en los órganos(148). El gen Klotho se localiza en múltiples órganos, incluidos el riñón, cerebro, paratiroides, testículos y glándula pituitaria (149)(150). De todos estos

órganos, el riñón es el que tiene los niveles más altos de Klotho, lo que indica que el riñón es el órgano que más Klotho produce (151).

Nuestros resultados no muestran diferencias significativas en las concentraciones de Klotho en suero entre los pacientes con ES y los controles sanos. Inicialmente hipotetizamos que los niveles de Klotho podrían estar más bajos en los pacientes con ES, debido a que se ha reportado que Klotho actúa como una molécula antiinflamatoria y antienvjecimiento (152).

Ya se han publicado algunos estudios en pacientes con ES, donde encontraron niveles de Klotho más bajos que en el grupo control (153) (154). Incluso un estudio relacionó niveles más bajos de Klotho en las pacientes con capilaroscopia más patológica (155), relacionando así las alteraciones de la microvasculatura en la ES, con lo niveles de Klotho. Una de las posibles explicaciones a que los niveles no estén disminuidos como en otros estudios, puede tener que ver con el estrés y la inflamación, tratándose de una respuesta compensatoria al proceso inflamatorio. A este respecto, los niveles séricos de Klotho se han encontrado extremadamente altos en sujetos con inflamación relacionada con estrés, como son los fumadores, sujetos con privación del sueño y sujetos con alto estrés psicológico. Estas situaciones conllevan una elevación de los marcadores de inflamación (156).

4.2 Klotho y riesgo cardiovascular.

Estudios de la última década han puesto el foco sobre el papel de Klotho como agente cardioprotector; previene el efecto del envejecimiento sobre el corazón y reduce la carga de ECV (157). Las funciones biológicas de sKlotho son independientes de FGFR-1 e incluye la regulación de la síntesis de óxido nítrico

endotelial, el mantenimiento de la integridad endotelial y la inhibición de la señal del factor de crecimiento (158) REV. Se ha visto que Klotho reduce la hipertrofia cardiaca producida por el estrés mediante la inhibición de los canales TRPC6 (transient receptor potential canonical 6) en los miocardiocitos (159) . Lim et al (81) encontraron que la deficiencia de Klotho potenciaba el desarrollo de calcificación arterial en humanos. Además, se ha visto que Klotho reduce la apoptosis del miocardiocito inducida por isoproterenol, previene la hipertrofia ventricular izquierda en ratones con insuficiencia renal y bloquea la hipertrofia del miocardiocito en vitro (160) (161).

Estudios recientes indican que Klotho está asociado con diferentes componentes del síndrome metabólico. En estudios experimentales, se ha comprobado que Klotho disminuye la disfunción endotelial, incrementa la producción de óxido nítrico y reduce la hipertensión arterial en modelos animales con síndrome metabólico (162) (163). Arking et al (164) observaron que una variante funcional del gen Klotho estaba asociado con un incremento de la tensión sistólica y un descenso de los niveles de HDL-c en 525 sujetos.

Respecto a los factores de riesgo cardiovascular, no encontramos correlación entre los niveles de Klotho y la mayoría de los factores de RCV. Al analizar las correlaciones de Klotho con el resto de variables, se observa que Klotho se relaciona significativamente con las siguientes: Edad, Peso, VOP, PropNterminal. Eliminando la variable Edad, la variable más significativa es el perímetro abdominal. Se observa una correlación negativa con la edad, el peso, perímetro abdominal, el propéptido N terminal y la VOP (cuando una aumenta, la otra

disminuye) y una correlación positiva con la edad, de forma que crecen conjuntamente.

No encontramos ninguna relación entre parámetros ecocardiográficos y Klotho. Al contrario que en el estudio de de Okamoto et al (165), entre los pacientes con FEVI conservada, las concentraciones séricas de α -Klotho se asociaron negativamente con la disfunción diastólica.

4.3 Klotho y metabolismo óseo.

Durante las pasadas dos décadas, ha habido una considerable controversia sobre el papel de sKlotho en la regulación del metabolismo mineral. Se ha propuesto que sKlotho puede actuar de una manera independiente a FGF-23, actuando como una hormona que inhibe la señal de la insulina (166) y suprimiendo la secreción de PTH en la glándula parótida (167). Modelos alternativos de la función de sKlotho sobre el metabolismo mineral se han construido sobre la actividad enzimática que sKlotho presenta como glucuronidasa o sialidasa (168)(169), modulando de este modo la función y la presencia de glicoproteínas de membrana mediante la modificación de sus patrones de glicosilación. mKlotho se une al FGFR-1152, convirtiéndose en un receptor específico para FGF-23 y de esta manera realizar su acción sobre el metabolismo mineral mediante la regulación en la excreción del calcio, potasio y fósforo.

En estudios experimentales (170), ratones carentes de la proteína Klotho presentaron una osteoporosis grave, disminución en el número de osteoblastos, en la actividad de la fosfatasa alcalina y en la formación de hueso, con un

porcentaje elevado de zonas no mineralizadas de hueso, tanto trabecular como cortical.

En relación al metabolismo fosfocálcico y a la masa ósea medida mediante densitometría, no encontramos correlación entre los niveles de Klotho y los niveles de fósforo sérico, calcio sérico, 25(OH)D, 1,25(OH₂)D₃ ni PTH. Sin embargo, en cuanto a los valores densitométricos, se observó una correlación negativa significativa con el T-Score y una tendencia correlacional con el Z-Score de columna en las pacientes con ES.

Estudios previos realizados, observaron que ratones carentes del gen Klotho desarrollaban osteoporosis (171) . Maruyama et al (172) describieron que la falta de la proteína Klotho en ratones disminuía la diferenciación del osteoblasto e inhibía su acción, interfiriendo de esta manera en el metabolismo óseo. Nosotros no hemos encontrado correlación entre los niveles de Klotho sérico y la densidad mineral ósea. Chalhoub et al (172), no encontraron tampoco relación entre los niveles de Klotho sérico, la densidad mineral ósea y el riesgo de fractura en una cohorte de pacientes ancianos. Una posible explicación a nuestra falta de asociación entre niveles de Klotho sérico y densidad mineral ósea podría ser que no hemos medido la forma de Klotho unido a transmembrana, la cual se piensa que es la que está involucrada en la regulación del metabolismo óseo, ya que es la que se une al FGF-23, permitiendo su acción.

5. Estudio de la endotelina-1.

Existe un desequilibrio alterado de las actividades proangiogénicas y antiangiogénicas en la ES, que provoca un crecimiento anormal de nuevos vasos (angiogénesis) o procesos de reparación defectuosos, isquemia y fibrosis (173). Las endotelinas son una familia de péptidos de 21 aminoácidos, producidos por las células endoteliales vasculares y tienen un papel clave en la vasoconstricción y la proliferación de células del músculo liso (174). La endotelina-1 (ET-1) es un potente vasoconstrictor endógeno, que media la proliferación de células de la pared vascular, la fibrosis y la inflamación a través de dos tipos de receptores ET-1 (ET-A y ET-B). En nuestro estudio, no hubo diferencias significativas en los niveles séricos de ET-1 entre pacientes con ES y controles sanos, probablemente debido al pequeño tamaño de la muestra.

La velocidad de la onda del pulso, es un índice validado de la distensibilidad arterial, la rigidez de las arterias grandes es un predictor potente e independiente del riesgo cardiovascular (104) (175). El tono del músculo liso influye en la rigidez de las arterias musculares y elásticas, y la eliminación del endotelio modifica la mecánica de las grandes arterias in vivo (176) lo que sugiere un grado de regulación funcional de la rigidez de las grandes arterias por mediadores vasoactivos derivados del endotelio. Curiosamente, revelamos una correlación positiva significativa entre los niveles séricos de ET-1 y la VOP en nuestros pacientes con ES, independientemente de la edad. McEniery et al (177) han demostrado que la infusión de ET-1 exógena aumenta la VOP en la arteria ílica ovina y que la infusión de un antagonista del receptor ET-A atenúa significativamente este efecto. Juntos, estos datos sugieren que la ET-1 endógena, actuando a través del receptor ET-A, regula la distensibilidad arterial in vivo. ET-1 también se asoció positivamente con la rigidez de las grandes arterias en pacientes

con enfermedad de las arterias coronarias (178). La regulación positiva de ET-1 activa las células inflamatorias y conduce a la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa asociada con la rigidez arterial (179).

6. Estudio de la homocisteína.

La hiperhomocisteinemia fue reconocida como un factor de riesgo independiente modificable para enfermedad coronaria, cerebral y enfermedades vasculares periféricas (180)(181). Estudios también han sugerido que la homocisteína induce una vascular del endotelio y conduce al daño vascular (182). En nuestro estudio, encontramos niveles de homocisteína significativamente elevados en pacientes con ES en comparación con controles sanos, lo que coincide con diferentes estudios (183)(184). Como ya hemos descrito anteriormente, también encontramos niveles séricos de BNP más altos en ES en comparación con el grupo control, que ya sabemos es un indicador ampliamente reconocido de riesgo cardiovascular en la ES (175). En nuestro estudio encontramos una correlación positiva significativa entre los niveles séricos de homocisteína y BNP en nuestros pacientes con ES, independientemente de la edad. Washio et al (185), observaron que los niveles de homocisteína se correlacionaban de forma positiva con el BNP en pacientes que habían sufrido infarto agudo de miocardio y también encontraron que la homocisteína elevada era factor de riesgo para desarrollar insuficiencia cardíaca en estos pacientes.

En nuestro estudio, no hubo diferencia significativa en la VOP entre pacientes con ES y controles sanos, coincidiendo con el estudio de Bartoloni et al (105). Este resultado puede estar sesgado por la mayor proporción de fumadores en el grupo

control (186), o por la mayor proporción de pacientes en tratamiento con bloqueadores de los canales de calcio (187).

El tono del músculo liso influye sobre la elasticidad de las arterias musculares de los vasos del endotelio y puede actúa sobre la mecánica de las grandes arterias in vivo (188), lo que sugiere una regulación funcional de la rigidez de la arteria mediada por elementos vasoactivos del endotelio. En el presente estudio, informamos por primera vez que niveles séricos elevados de homocisteína están correlacionados con la VOP en pacientes con ES. La rigidez arterial y homocisteína son ambos poderosos predictores de enfermedad cardiovascular. La homocisteína puede aumentar la rigidez vascular al dañar las fibras de elastina, aumentar la producción de colágeno a través de la activación de metaloproteinasas, y estimulando las células del músculo liso proliferación (189). Estudios previos han informado una asociación significativa de la concentración sérica de homocisteína con diferentes índices de rigidez arterial, incluyendo la presión del pulso y la aorta rigidez evaluada por CF-VOP (VOP carotido-femoral) en la población general (190). Zhang y Alabama (191) encontraron que la concentración sérica de homocisteína se asoció positivamente con rigidez arterial, medida como CF-VOP en los sujetos de edad avanzada. Xiao et al (192) detectó una asociación positiva significativa entre homocisteína sérica y arterial rigidez, medida como CF-VOP, en sujetos hipertensos. También encontramos una correlación positiva entre los niveles séricos de homocisteína y la enfermedad duración en mujeres con ES. Al respecto, Sabio et al (193), describieron una correlación positiva entre el suero homocisteína niveles y duración de la enfermedad en mujeres con lupus eritematoso sistémico.

VIII.CONCLUSIONES.

1. En pacientes con ES no encontramos diferencias significativas en cuanto a los niveles de FGF-23, Klotho y endotelina-1, tras comparar con un grupo control.
2. FGF-23 se encuentra aumentado en las pacientes con ES que presentan calcinosis lo que puede que esta molécula participe en la patogenia de las mismas.
3. Tras investigar la relación de FGF-23 con la DMO y el riesgo de fractura en pacientes mujeres con ES, y los resultados revelaron que el FGF-23 sérico no estaba relacionado con las DMO, pero sí con el riesgo de fractura determinado con FRAX. Ambos factores obligan a mantener una actitud diagnóstica y terapéutica al respecto más agresiva que en población general, con empleo con mayor frecuencia de suplementos de vitamina D y calcio.
4. La asociación entre FGF-23 y niveles disminuidos de HDL en las pacientes con ES sugiere la participación de la hormona en el incremento del riesgo cardiovascular de estos pacientes a través de alteraciones en el metabolismo lipídico.
5. Existe una correlación positiva entre los niveles séricos de homocisteína y VOP, lo que indica que los altos niveles de homocisteína pueden estar involucrados en el desarrollo de la rigidez vascular en pacientes con ES.
6. La ET-1 está asociada con VOP en mujeres con ES. Por lo tanto, los fármacos que bloquean ET-1 podrían ser efectivos para reducir la rigidez de las arterias grandes en mujeres con ES y, por lo tanto, el riesgo cardiovascular.
7. El daño, la fibrosis y la autoinmunidad hacen de la ES un modelo intrigante para investigar la fisiopatología del daño aterosclerótico en las

enfermedades sistémicas autoinmunes. La disfunción endotelial y la lesión de las células endoteliales microvasculares pueden considerarse no solo como marcadores de aterosclerosis sino también como expresión de mecanismos patogénicos en la ES.

IX.LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

Las principales limitaciones de nuestro estudio serían:

- El tamaño muestral de nuestra serie es relativamente pequeño, por lo que probablemente no se hayan conseguido establecer diferencias estadísticamente significativas al analizar determinados parámetros por falta de potencia estadística.
- Se trata de estudio transversal que refleja el estado de una población en un período concreto. Seleccionamos solo mujeres para el estudio porque la enfermedad se encuentra presente de forma mayoritaria en el sexo femenino y la distribución de la concentración de FGF-23 difería según el sexo. El sexo femenino se asoció con una mayor concentración de FGF-23 al inicio (194), para excluir estos problemas, seleccionamos mujeres en el presente estudio, por lo que los hallazgos de este estudio no pueden extrapolarse a hombres con ES.
- El diseño transversal de este estudio no permite sacar inferencias causales.
- La falta de datos sobre el folato y la vitamina de B12 en estos sujetos hizo imposible analizar su posible influencia en los niveles séricos de homocisteína.

- En nuestro estudio, al ser una muestra pequeña, solo 12 pacientes presentaban calcinosis.
- Hemos recogido la presencia de fracturas mediante un cuestionario, lo que implica que solo se pueden registrar fracturas clínicas.
- En nuestro estudio hemos valorado la fracción soluble de Klotho, pero no hemos realizado test inmunohistoquímicos en los tejidos, por lo que no hemos podido medir el Klotho que se encuentra unido a su receptor en la membrana celular.

X.RESUMEN

Esta demostrado que las pacientes con ES, tienen más riesgo de enfermedad cardiovascular, incluso en ausencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos. El FGF-23 y su correceptor Klotho son nuevas moléculas que juegan un papel clave en las alteraciones del metabolismo mineral óseo, y se ha propuesto que pueden estar implicadas en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Nuestro objetivo es comparar los niveles de Klotho y FGF-23 entre pacientes con ES y un grupo de control de sujetos sanos. Valorar la posible relación entre FGF-23 y su correceptor Klotho con diferentes características de la enfermedad y su papel potencial como marcador subrogado de enfermedad cardiovascular. Estudiamos también los niveles de endotelina-1 y homocisteína, así como su relación con FRCV y osteoporosis.

Métodos: Sesenta y dos pacientes con ES fueron reclutados en el área sanitaria de la provincia de Granada, y sesenta y dos controles sanos de la misma edad y sexo fueron incluidos en el estudio. Los niveles de Klotho y FGF-23 fueron analizados mediante ELISA.

Resultados: No encontramos diferencias entre los niveles de FGF-23 y Klotho entre pacientes y controles. Encontramos niveles más elevados de FGF-23 en las pacientes que presentaban calcinosis ($p < 0,05$). Encontramos además asociación de FGF-23 con el riesgo de fractura determinado por FRAX y una correlación negativa con los niveles de HDL ($p < 0,05$). Hemos observado una correlación negativa de Klotho tanto con la VOP como en la DMO lumbar de las pacientes. En cuanto al estudio de la homocisteína encontramos una correlación positiva entre los niveles de homocisteína y la VOP, por lo que podría estar implicada en la rigidez arterial y obtuvimos datos similares con la ET-1.

Conclusiones: Aunque no encontramos diferencias en los niveles de FGF-23 y Klotho en las pacientes con ES respecto a los controles, si que encontramos ciertas correlaciones que podría explicar de que forma participan ambas moléculas en la enfermedad. El interés fundamental que se deriva de los hallazgos descritos es la posibilidad que existe de controlar muchos de los factores implicados en la patogenia de la aterosclerosis y la osteoporosis en pacientes con ES consiguiendo, con ello, prevenirlas. De este modo resulta fundamental en los pacientes con ES el control estrecho de FRCV reversibles y la valoración de osteoporosis.

Palabras clave: FGF-23, Klotho, esclerosis sistémica, enfermedad cardiovascular, osteoporosis.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Armando Laborde H, Young P. [History of systemic sclerosis]. *Gac Med Mex.* abril de 2012;148(2):201-8.
2. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primer.* 17 de diciembre de 2015;1(1):15002.
3. Ingegnoli F, Ughi N, Mihai C. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* abril de 2018;32(2):223-40.
4. Simeón-Aznar CP, Fonollosa-Plá V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Ramos-Casals M, Campillo-Grau M, et al. Registry of the Spanish Network for Systemic Sclerosis: Clinical Pattern According to Cutaneous Subsets and Immunological Status. *Semin Arthritis Rheum.* junio de 2012;41(6):789-800.
5. Korman BD, Criswell LA. Recent Advances in the Genetics of Systemic Sclerosis: Toward Biological and Clinical Significance. *Curr Rheumatol Rep.* marzo de 2015;17(3):21.
6. López-Isac E, Acosta-Herrera M, Kerick M, Assassi S, Satpathy AT, Granja J, et al. GWAS for systemic sclerosis identifies multiple risk loci and highlights fibrotic and vasculopathy pathways. *Nat Commun.* 31 de octubre de 2019;10(1):4955.
7. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *The Lancet.* octubre de 2017;390(10103):1685-99.
8. Korman B. Evolving insights into the cellular and molecular pathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. *Transl Res.* julio de 2019;209:77-89.
9. Stern EP, Denton CP. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Rheum Dis Clin N Am.* agosto de 2015;41(3):367-82.
10. Frech TM, Mar D. Gastrointestinal and Hepatic Disease in Systemic Sclerosis. *Rheum Dis Clin N Am.* febrero de 2018;44(1):15-28.
11. Cottin V, Brown KK. Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis (SSc-ILD). *Respir Res.* diciembre de 2019;20(1):13.
12. Muresan L, Petcu A, Pamfil C, Muresan C, Rinzis M, Mada RO, et al. Cardiovascular profiles of scleroderma patients with arrhythmias and conduction disorders. *Acta Reumatol Port.* marzo de 2016;41(1):26-39.
13. Stochmal A, Czuwara J, Trojanowska M, Rudnicka L. Antinuclear Antibodies

- in Systemic Sclerosis: an Update. *Clin Rev Allergy Immunol.* febrero de 2020;58(1):40-51.
14. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* noviembre de 2013;65(11):2737-47.
 15. McMahan ZH, Volkman ER. An update on the pharmacotherapeutic options and treatment strategies for systemic sclerosis. *Expert Opin Pharmacother.* 1 de noviembre de 2020;21(16):2041-56.
 16. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Paolino S, Smith V. Systemic sclerosis: markers and targeted treatments. *Syst Scler.* :7.
 17. Giacomelli R, Liakouli V, Berardicurti O, Ruscitti P, Di Benedetto P, Carubbi F, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: current and future treatment. *Rheumatol Int.* junio de 2017;37(6):853-63.
 18. Simeón-Aznar CP, Fonollosa-Plá V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Campillo-Grau M, Ramos-Casals M, et al. Registry of the Spanish Network for Systemic Sclerosis: Survival, Prognostic Factors, and Causes of Death. *Medicine (Baltimore).* octubre de 2015;94(43):e1728.
 19. Poudel DR, Jayakumar D, Danve A, Sehra ST, Derk CT. Determinants of mortality in systemic sclerosis: a focused review. *Rheumatol Int.* octubre de 2018;38(10):1847-58.
 20. Dimitroulas T, Sarafidis P, Roma V, Karagiannopoulou G, Kapoulas S, Dimitroula H, et al. Scleroderma renal crisis accompanied by new-onset pulmonary arterial hypertension: an acute systemic endothelial injury? Case report and literature. *Inflamm Allergy Drug Targets.* septiembre de 2010;9(4):313-8.
 21. Hao Y, Hudson M, Baron M, Carreira P, Stevens W, Rabusa C, et al. Early Mortality in a Multinational Systemic Sclerosis Inception Cohort. *Arthritis Rheumatol.* mayo de 2017;69(5):1067-77.
 22. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airò P, Cozzi F, Carreira PE, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis.* 1 de octubre de 2010;69(10):1809.
 23. Man A, Zhu Y, Zhang Y, Dubreuil M, Rho YH, Peloquin C, et al. The risk of cardiovascular disease in systemic sclerosis: a population-based cohort study. *Ann Rheum Dis.* julio de 2013;72(7):1188-93.
 24. Aviña-Zubieta JA, Man A, Yurkovich M, Huang K, Sayre EC, Choi HK. Early Cardiovascular Disease After the Diagnosis of Systemic Sclerosis. *Am J Med.* 1 de marzo de 2016;129(3):324-31.

25. Cannarile F, Valentini V, Mirabelli G, Alunno A, Terenzi R, Luccioli F, et al. Cardiovascular disease in systemic sclerosis. *Ann Transl Med.* enero de 2015;3(1):8.
26. Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: Evidence That Systemic Sclerosis Is a Vascular Disease. *Arthritis Rheum.* 2013;65(8):1953-62.
27. Psarras A, Soulaïdopoulos S, Garyfallos A, Kitas G, Dimitroulas T. A critical view on cardiovascular risk in systemic sclerosis. *Rheumatol Int.* enero de 2017;37(1):85-95.
28. Nussinovitch U, Shoenfeld Y. Atherosclerosis and macrovascular involvement in systemic sclerosis: Myth or reality. *Autoimmun Rev.* marzo de 2011;10(5):259-66.
29. Au K, Singh MK, Bodukam V, Bae S, Maranian P, Ogawa R, et al. Atherosclerosis in systemic sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheum.* julio de 2011;63(7):2078-90.
30. Bartoli F, Blagojevic J, Bacci M, Fiori G, Tempestini A, Conforti ML, et al. Flow-Mediated Vasodilation and Carotid Intima-Media Thickness in Systemic Sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1 de junio de 2007;1108(1):283-90.
31. Hettema ME, Zhang D, de Leeuw K, Stienstra Y, Smit AJ, Kallenberg CGM, et al. Early atherosclerosis in systemic sclerosis and its relation to disease or traditional risk factors. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(2):R49.
32. Ho M, Veale D. Macrovascular disease and systemic sclerosis. :5.
33. Schiopu E, Au KM, McMahan MA, Kaplan MJ, Divekar A, Singh RR, et al. Prevalence of subclinical atherosclerosis is increased in systemic sclerosis and is associated with serum proteins: a cross-sectional, controlled study of carotid ultrasound. *Rheumatology.* 1 de abril de 2014;53(4):704-13.
34. Rollando D, Bezante GP, Sulli A, Balbi M, Panico N, Pizzorni C, et al. Brachial Artery Endothelial-dependent Flow-mediated Dilation Identifies Early-stage Endothelial Dysfunction in Systemic Sclerosis and Correlates with Nailfold Microvascular Impairment. *J Rheumatol.* 1 de junio de 2010;37(6):1168-73.
35. Stücker M, Quinna S, Memmel U, Röchling A, Traupe M, Hoffmann K, et al. Macroangiopathy of the upper extremities in progressive systemic sclerosis. *Eur J Med Res.* 19 de julio de 2000;5(7):295-302.
36. Komócsi A, Pintér T, Faludi R, Magyari B, Bozó J, Kumánovics G, et al. Overlap of coronary disease and pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1 de enero de 2010;69(01):202-5.
37. Khurma V, Meyer C, Park GS, McMahan M, Lin J, Singh RR, et al. A pilot study of subclinical coronary atherosclerosis in systemic sclerosis: Coronary artery calcification in cases and controls. *Arthritis Rheum.* 15 de abril de 2008;59(4):591-7.

38. Tarek EG, Yasser AE, Gheita T. Coronary angiographic findings in asymptomatic systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* julio de 2006;25(4):487-90.
39. Fernández-Codina A, Simeón-Aznar CP, Pinal-Fernandez I, Rodríguez-Palomares J, Pizzi MN, Hidalgo CE, et al. Cardiac involvement in systemic sclerosis: differences between clinical subsets and influence on survival. *Rheumatol Int.* 1 de enero de 2017;37(1):75-84.
40. Fernandes F, Ramires FJA, Arteaga E, Ianni BM, Bonfá ESDO, Mady C. Cardiac remodeling in patients with systemic sclerosis with no signs or symptoms of heart failure: An endomyocardial biopsy study. *J Card Fail.* agosto de 2003;9(4):311-7.
41. Long A, Duffy G, Bresnihan B. Reversible myocardial perfusion defects during cold challenge in scleroderma. *Br J Rheumatol.* mayo de 1986;25(2):158-61.
42. Follansbee WP, Curtiss EI, Medsger TA, Steen VD, Uretsky BF, Owens GR, et al. Physiologic abnormalities of cardiac function in progressive systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *N Engl J Med.* 19 de enero de 1984;310(3):142-8.
43. Barison A, Gargani L, De Marchi D, Aquaro GD, Guiducci S, Picano E, et al. Early myocardial and skeletal muscle interstitial remodelling in systemic sclerosis: insights from extracellular volume quantification using cardiovascular magnetic resonance. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* enero de 2015;16(1):74-80.
44. Ngian GS, Sahhar J, Wicks IP, Van Doornum S. Cardiovascular disease in systemic sclerosis - an emerging association? *Arthritis Res Ther.* 2011;13(4):237.
45. Zakopoulos NA, Kotsis VT, Gialafos EJ, Papamichael CM, Pitiriga VC, Mitsibounas DN, et al. Systemic sclerosis is not associated with clinical or ambulatory blood pressure. *Clin Exp Rheumatol.* abril de 2003;21(2):199-204.
46. Zeng Y, Li M, Xu D, Hou Y, Wang Q, Fang Q, et al. Macrovascular involvement in systemic sclerosis: evidence of correlation with disease activity. *Clin Exp Rheumatol.* abril de 2012;30(2 Suppl 71):S76-80.
47. Lippi G, Caramaschi P, Montagnana M, Salvagno GL, Volpe A, Guidi G. Lipoprotein[a] and the lipid profile in patients with systemic sclerosis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* febrero de 2006;364(1-2):345-8.
48. Borba EF, Borges CTL, Bonfá E. Lipoprotein profile in limited systemic sclerosis. *Rheumatol Int.* junio de 2005;25(5):379-83.
49. Sedky Abdou MM, El Desouky SM, Helmy El Kaffas KM, Ahmed Hassan AM.

- Premature atherosclerosis in systemic sclerosis patients: Its relation to disease parameters and to traditional risk factors. *Int J Rheum Dis.* marzo de 2017;20(3):383-9.
50. Panopoulos S, Tektonidou M, Drosos AA, Liosis SN, Dimitroulas T, Garyfallos A, et al. Prevalence of comorbidities in systemic sclerosis versus rheumatoid arthritis: a comparative, multicenter, matched-cohort study. *Arthritis Res Ther.* diciembre de 2018;20(1):267.
 51. Zegkos T, Kitas G, Dimitroulas T. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: assessment, management and next steps. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* junio de 2016;8(3):86-101.
 52. Nordin A, Jensen-Urstad K, Björnådal L, Pettersson S, Larsson A, Svenungsson E. Ischemic arterial events and atherosclerosis in patients with systemic sclerosis: a population-based case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(4):R87.
 53. Ngian GS, Sahhar J, Proudman SM, Stevens W, Wicks IP, Van Doornum S. Prevalence of coronary heart disease and cardiovascular risk factors in a national cross-sectional cohort study of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* diciembre de 2012;71(12):1980-3.
 54. Ahmed S, Palevsky HI. Pulmonary arterial hypertension related to connective tissue disease: a review. *Rheum Dis Clin North Am.* febrero de 2014;40(1):103-24.
 55. Voilliot D, Magne J, Dulgheru R, Kou S, Henri C, Caballero L, et al. Cardiovascular outcome in systemic sclerosis. *Acta Cardiol.* octubre de 2015;70(5):554-63.
 56. Silva I, Teixeira A, Oliveira J, Almeida R, Vasconcelos C. Endothelial dysfunction, microvascular damage and ischemic peripheral vasculopathy in systemic sclerosis. *Clin Hemorheol Microcirc.* 10 de junio de 2017;66(2):117-30.
 57. Allanore Y, Distler O, Matucci-Cerinic M, Denton CP. Review: Defining a Unified Vascular Phenotype in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* febrero de 2018;70(2):162-70.
 58. Ozen G, Inanc N, Unal AU, Korkmaz F, Sunbul M, Ozmen M, et al. Subclinical Atherosclerosis in Systemic Sclerosis: Not Less Frequent Than Rheumatoid Arthritis and Not Detected With Cardiovascular Risk Indices: Atherosclerosis and Cardiovascular Risk Assessment in Systemic Sclerosis. *Arthritis Care Res.* octubre de 2016;68(10):1538-46.
 59. Chen J, Lei L, Pan J, Zhao C. A meta-analysis of fracture risk and bone mineral density in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* abril de 2020;39(4):1181-9.

60. Omair MA, Pagnoux C, McDonald-Blumer H, Johnson SR. Low bone density in systemic sclerosis. A systematic review. *J Rheumatol.* noviembre de 2013;40(11):1881-90.
61. Rios-Fernández R, Callejas-Rubio JL, Fernández-Roldán C, Simeón-Aznar CP, García-Hernández F, Castillo-García MJ, et al. Bone mass and vitamin D in patients with systemic sclerosis from two Spanish regions. *Clin Exp Rheumatol.* diciembre de 2012;30(6):905-11.
62. Dovio A, Data V, Carignola R, Calzolari G, Vitetta R, Ventura M, et al. Circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* noviembre de 2008;35(11):2206-13.
63. Marot M, Valéry A, Esteve E, Bens G, Müller A, Rist S, et al. Prevalence and predictive factors of osteoporosis in systemic sclerosis patients: a case-control study. *Oncotarget.* 20 de junio de 2015;6(17):14865-73.
64. Giuggioli D, Colaci M, Cassone G, Fallahi P, Lumetti F, Spinella A, et al. Serum 25-OH vitamin D levels in systemic sclerosis: analysis of 140 patients and review of the literature. *Clin Rheumatol.* marzo de 2017;36(3):583-90.
65. Fernández RR, Roldán CF, Rubio JLC, Centeno NO. Vitamin D Deficiency in a Cohort of Patients with Systemic Scleroderma from the South of Spain. *J Rheumatol.* junio de 2010;37(6):1355-1355.
66. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Forster R, Saini R, Hsieh JC, et al. The role of vitamin D in the FGF23, klotho, and phosphate bone-kidney endocrine axis. *Rev Endocr Metab Disord.* marzo de 2012;13(1):57-69.
67. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* marzo de 2004;19(3):429-35.
68. Krajisnik T, Björklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerström G, Jonsson KB, et al. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol.* octubre de 2007;195(1):125-31.
69. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, et al. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* septiembre de 2010;24(9):3438-50.
70. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature.* 7 de diciembre de 2006;444(7120):770-4.
71. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and Function of the FGF23/Klotho Endocrine Pathways. *Physiol Rev.* enero de 2012;92(1):131-

- 55.
72. Gutiérrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collerone G, et al. Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation*. 19 de mayo de 2009;119(19):2545-52.
 73. Shibata K, Fujita SI, Morita H, Okamoto Y, Sohmiya K, Hoshiga M, et al. Association between circulating fibroblast growth factor 23, α -Klotho, and the left ventricular ejection fraction and left ventricular mass in cardiology inpatients. *PloS One*. 2013;8(9):e73184.
 74. Touchberry CD, Green TM, Tchikrizov V, Mannix JE, Mao TF, Carney BW, et al. FGF23 is a novel regulator of intracellular calcium and cardiac contractility in addition to cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 15 de abril de 2013;304(8):E863-873.
 75. Lutsey PL, Alonso A, Selvin E, Pankow JS, Michos ED, Agarwal SK, et al. Fibroblast Growth Factor-23 and Incident Coronary Heart Disease, Heart Failure, and Cardiovascular Mortality: The Atherosclerosis Risk In Communities Study. *J Am Heart Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis*. 10 de junio de 2014;3(3):e000936.
 76. Kestenbaum B, Sachs MC, Hoofnagle AN, Siscovick DS, Ix JH, Robinson-Cohen C, et al. Fibroblast Growth Factor-23 and Cardiovascular Disease in the General Population: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Heart Fail*. mayo de 2014;7(3):409-17.
 77. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1 de noviembre de 1997;390(6655):45-51.
 78. Lindberg K, Olauson H, Amin R, Ponnusamy A, Goetz R, Taylor RF, et al. Arterial klotho expression and FGF23 effects on vascular calcification and function. *PloS One*. 2013;8(4):e60658.
 79. Six I, Okazaki H, Gross P, Cagnard J, Boudot C, Maizel J, et al. Direct, Acute Effects of Klotho and FGF23 on Vascular Smooth Muscle and Endothelium. Bader M, editor. *PLoS ONE*. 2 de abril de 2014;9(4):e93423.
 80. Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Suárez-Alvarez B, Lopez-Larrea C, Jakubowski A, et al. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal klotho expression through NF κ B. *J Am Soc Nephrol JASN*. julio de 2011;22(7):1315-25.
 81. Lim K, Lu TS, Molostvov G, Lee C, Lam FT, Zehnder D, et al. Vascular Klotho Deficiency Potentiates the Development of Human Artery Calcification and Mediates Resistance to Fibroblast Growth Factor 23. *Circulation*. 8 de mayo de 2012;125(18):2243-55.
 82. Shoben AB, Rudser KD, de Boer IH, Young B, Kestenbaum B. Association of

- oral calcitriol with improved survival in nondialyzed CKD. *J Am Soc Nephrol JASN*. agosto de 2008;19(8):1613-9.
83. van Ark J, Hammes HP, van Dijk MCRF, Vervloet MG, Wolffenbuttel BHR, van Goor H, et al. Circulating alpha-klotho levels are not disturbed in patients with type 2 diabetes with and without macrovascular disease in the absence of nephropathy. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12(1):116.
 84. Allard L, Demoncheaux N, Machuca-Gayet I, Georgess D, Coury-Lucas F, Jurdic P, et al. Biphasic Effects of Vitamin D and FGF23 on Human Osteoclast Biology. *Calcif Tissue Int*. julio de 2015;97(1):69-79.
 85. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, et al. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. junio de 2008;23(6):939-48.
 86. Lane NE, Parimi N, Corr M, Yao W, Cauley JA, Nielson CM, et al. Association of Serum Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) and incident fractures in older men: the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. noviembre de 2013;28(11):2325-32.
 87. Wei X, Huang X, Liu N, Qi B, Fang S, Zhang Y. Understanding the Stony Bridge between Osteoporosis and Vascular Calcification: Impact of the FGF23/Klotho axis. Michele C, editor. *Oxid Med Cell Longev*. 30 de agosto de 2021;2021:1-9.
 88. Talotta R, Bongiovanni S, Letizia T, Rigamonti F, Ditto MC, Atzeni F, et al. Measurement of Serum Klotho in Systemic Sclerosis. *Dis Markers*. 2017;2017:1-7.
 89. Ahmadi R, Hajjalilo M, Ghorbanihaghjo A, Mota A, Raeisi S, Bargahi N, et al. FGF-23, Klotho and Vitamin D Levels in Scleroderma. *Iran J Public Health*. 2017;46:7.
 90. Hajjalilo M, Noorabadi P, Tahsini Tekantapeh S, Malek Mahdavi A. Endothelin-1, α -Klotho, 25(OH) Vit D levels and severity of disease in scleroderma patients. *Rheumatol Int*. octubre de 2017;37(10):1651-7.
 91. Kotyla PJ, Kruszczyk Z, Zytrowska A, Owczarek AJ, Olszanecka-Glinianowicz M, Chudek J. Fibroblast Growth Factor 23 to Alpha-Klotho Index Correlates with Systemic Sclerosis Activity: A Proposal for Novel Disease Activity Marker. *J Clin Med*. 17 de diciembre de 2018;7(12).
 92. Mazzotta C, Manetti M, Rosa I, Romano E, Blagojevic J, Bellando-Randone S, et al. Proangiogenic effects of soluble α -Klotho on systemic sclerosis dermal microvascular endothelial cells. *Arthritis Res Ther*. diciembre de 2017;19(1):27.
 93. Niazy MH, Gaber W, Sayed S, Shaker OG, Gheita TA. The anti-aging protein

- alpha-Klotho in systemic sclerosis patients: does a relationship to telangiectasia exist? *Z Für Rheumatol.* mayo de 2020;79(4):404-9.
94. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeón CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* octubre de 2014;44(2):208-19.
 95. Dave AJ, Fiorentino D, Lingala B, Krishnan E, Chung L. Atherosclerotic cardiovascular disease in hospitalized patients with systemic sclerosis: higher mortality than patients with lupus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* febrero de 2014;66(2):323-7.
 96. Rosato E, Tubani L, Gigante A. QTc interval prolongation in systemic sclerosis. *Int J Cardiol.* julio de 2017;239:34.
 97. Sgreccia A, Morelli S, Ferrante L, Perrone C, De Marzio P, De Vincentiis G, et al. QT interval and QT dispersion in systemic sclerosis (scleroderma). *J Intern Med.* febrero de 1998;243(2):127-32.
 98. Rosato E, Gigante A, Liberatori M, Gasperini ML, Sardo L, Amoroso A, et al. QTc interval prolongation in systemic sclerosis: Correlations with clinical variables. *Int J Cardiol.* marzo de 2015;182:20-2.
 99. Morelli S, Sgreccia A, Ferrante L, Barbieri C, Bernardo ML, Perrone C, et al. Relationships between electrocardiographic and echocardiographic findings in systemic sclerosis (scleroderma). *Int J Cardiol.* diciembre de 1996;57(2):151-60.
 100. Muangchan C, Harding S, Khimdas S, Bonner A, Canadian Scleroderma Research group, Baron M, et al. Association of C-reactive protein with high disease activity in systemic sclerosis: results from the Canadian Scleroderma Research Group. *Arthritis Care Res.* septiembre de 2012;64(9):1405-14.
 101. Hoffmann-Vold AM, Fretheim H, Meier C, Maurer B. Circulating biomarkers of systemic sclerosis – interstitial lung disease. *J Scleroderma Relat Disord.* marzo de 2020;5(2 Suppl):41-7.
 102. Cardiac Biomarkers in Systemic Sclerosis: Contribution of High-Sensitivity Cardiac Troponin in Addition to N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide. [citado 2 de junio de 2022]; Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acr.22547>
 103. Mathai SC, Bueso M, Hummers LK, Boyce D, Lechtzin N, Pavac JL, et al. Disproportionate elevation of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in scleroderma-related pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 1 de enero de 2010;35(1):95-104.
 104. Elshamy HA, Ibrahim SE, Farouk HM, Moustafa AA, Aly IM, Osman WM. N-terminal pro-brain natriuretic peptide in systemic sclerosis: new insights.

- Eur J Dermatol EJD. octubre de 2011;21(5):686-90.
105. Bartoloni E, Pucci G, Cannarile F, Battista F, Alunno A, Giuliani M, et al. Central Hemodynamics and Arterial Stiffness in Systemic Sclerosis. Hypertension. diciembre de 2016;68(6):1504-11.
 106. Liu J, Zhang Y, Cao TS, Duan YY, Yuan LJ, Yang YL, et al. Preferential macrovasculopathy in systemic sclerosis detected by regional pulse wave velocity from wave intensity analysis: Comparisons of local and regional arterial stiffness parameters in cases and controls. Arthritis Care Res. abril de 2011;63(4):579-87.
 107. Timár O, Soltész P, Szamosi S, Dér H, Szántó S, Szekanecz Z, et al. Increased Arterial Stiffness as the Marker of Vascular Involvement in Systemic Sclerosis. J Rheumatol. 1 de julio de 2008;35(7):1329-33.
 108. Aïssou L, Meune C, Avouac J, Meunier M, Elhaï M, Sorbets E, et al. Small, medium but not large arteries are involved in digital ulcers associated with systemic sclerosis. Joint Bone Spine. 1 de julio de 2016;83(4):444-7.
 109. Mirza MAI, Larsson A, Melhus H, Lind L, Larsson TE. Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population. Atherosclerosis. diciembre de 2009;207(2):546-51.
 110. Tadic M, Zlatanovic M, Cuspidi C, Ivanovic B, Stevanovic A, Damjanov N, et al. The relationship between left ventricular deformation and heart rate variability in patients with systemic sclerosis: Two- and three-dimensional strain analysis. Int J Cardiol. junio de 2017;236:145-50.
 111. Hinchcliff M, Desai CS, Varga J, Shah SJ. Prevalence, Prognosis, and Factors Associated with Left Ventricular Diastolic Dysfunction in Systemic Sclerosis. Clin Exp Rheumatol. 2012;30(2 Suppl 71):S30-7.
 112. Corrado A, Colia R, Mele A, Di Bello V, Trotta A, Neve A, et al. Relationship between Body Mass Composition, Bone Mineral Density, Skin Fibrosis and 25(OH) Vitamin D Serum Levels in Systemic Sclerosis. Assassi S, editor. PLOS ONE. 16 de septiembre de 2015;10(9):e0137912.
 113. Serup J, Hagdrup HK. Parathyroid hormone and calcium metabolism in generalized scleroderma: Increased PTH level and secondary hyperparathyroidism in patients with aberrant calcifications. Prophylactic treatment of calcinosis. Arch Dermatol Res. 1984;276(2):91-5.
 114. Atteritano M, Sorbara S, Bagnato G, Miceli G, Sangari D, Morgante S, et al. Bone Mineral Density, Bone Turnover Markers and Fractures in Patients with Systemic Sclerosis: A Case Control Study. PLoS ONE. 20 de junio de 2013;8(6):e66991.
 115. Colaci M, Giuggioli D, Manfredi A, Sebastiani M, Coppi F, Rossi R, et al. Aortic pulse wave velocity measurement in systemic sclerosis patients.

- Reumatismo. 20 de diciembre de 2012;64(6):360-7.
116. Avenatti E, Bruno G, Priora M, Parisi S, Ballini C, Veglio F, et al. Cardiovascular Organ Damage in Clinical Subtypes of Systemic Sclerosis: Arterial Stiffness and Echocardiography Might Not Be the Ideal Tools for Patient Risk Stratification. Della Rocca D, editor. *Cardiol Res Pract*. 23 de abril de 2021;2021:1-7.
 117. Chuealee W, Foocharoen C, Mahakkanukrauh A, Suwannaroj S, Pongchaiyakul C, Nanagara R. Prevalence and predictive factors of osteoporosis in Thai systemic sclerosis. *Sci Rep*. 3 de mayo de 2021;11:9424.
 118. Ahmadi R, Hajjalilo M, Ghorbanihaghjo A, Mota A, Raeisi S, Bargahi N, et al. FGF-23, Klotho and Vitamin D Levels in Scleroderma. *Iran J Public Health*. 2017;46:7.
 119. Shenavandeh S, Radmanesh S, Kamali Sarvestani E, Nazarinia MA, Omrani GR. Fibroblast growth factor-23 in patients with systemic sclerosis: A case-control study. *Egypt Rheumatol*. abril de 2016;38(2):105-9.
 120. Nasrallah MM, El-Shehaby AR, Salem MM, Osman NA, El Sheikh E, Sharaf El Din UAA. Fibroblast growth factor-23 (FGF-23) is independently correlated to aortic calcification in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. agosto de 2010;25(8):2679-85.
 121. Mattoo RL. The Roles of Fibroblast Growth Factor (FGF)-23, α -Klotho and Furin Protease in Calcium and Phosphate Homeostasis : A Mini-Review. *Indian J Clin Biochem*. enero de 2014;29(1):8-12.
 122. Faul C, Amaral AP, Oskoueï B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest*. 1 de noviembre de 2011;121(11):4393-408.
 123. Paracrine Effects of FGF23 on the Heart - PMC [Internet]. [citado 7 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5985311/>
 124. Mirza MAI, Larsson A, Lind L, Larsson TE. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community. *Atherosclerosis*. agosto de 2009;205(2):385-90.
 125. Mirza MAI, Hansen T, Johansson L, Ahlström H, Larsson A, Lind L, et al. Relationship between circulating FGF23 and total body atherosclerosis in the community. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. octubre de 2009;24(10):3125-31.
 126. Morita H, Takeda Y, Fujita S ichi, Okamoto Y, Sakane K, Teramoto K, et al. Gender Specific Association between Serum Fibroblast Growth Factor 23/ α -Klotho and Coronary Artery and Aortic Valve Calcification. *J Atheroscler*

- Thromb. 2015;22(12):1338-46.
127. Shah NH, Dong C, Elkind MSV, Sacco RL, Mendez AJ, Hudson BI, et al. Fibroblast Growth Factor 23 Is Associated With Carotid Plaque Presence and Area: The Northern Manhattan Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* septiembre de 2015;35(9):2048-53.
 128. Mirza MAI, Alsiö J, Hammarstedt A, Erben RG, Michaëlsson K, Tivesten A, et al. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with fat mass and dyslipidemia in two independent cohorts of elderly individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* enero de 2011;31(1):219-27.
 129. Zaheer S, de Boer IH, Allison M, Brown JM, Psaty BM, Robinson-Cohen C, et al. Fibroblast Growth Factor 23, Mineral Metabolism, and Adiposity in Normal Kidney Function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 de abril de 2017;102(4):1387-95.
 130. Andrukhova O, Streicher C, Zeitz U, Erben RG. Fgf23 and parathyroid hormone signaling interact in kidney and bone. *Mol Cell Endocrinol.* noviembre de 2016;436:224-39.
 131. Munoz Mendoza J, Isakova T, Ricardo AC, Xie H, Navaneethan SD, Anderson AH, et al. Fibroblast growth factor 23 and Inflammation in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* julio de 2012;7(7):1155-62.
 132. Sato H, James Kazama J, Murasawa A, Otani H, Abe A, Ito S, et al. Serum Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Intern Med.* 2016;55(2):121-6.
 133. Sakoh T, Nakayama M, Tsuchihashi T, Yoshitomi R, Tanaka S, Katafuchi E, et al. Associations of fibroblast growth factor 23 with urate metabolism in patients with chronic kidney disease. *Metabolism.* octubre de 2016;65(10):1498-507.
 134. Montford JR, Chonchol M, Cheung AK, Kaufman JS, Greene T, Roberts WL, et al. Low body mass index and dyslipidemia in dialysis patients linked to elevated plasma fibroblast growth factor 23. *Am J Nephrol.* 2013;37(3):183-90.
 135. Fukumoto S. Actions and mode of actions of FGF19 subfamily members. *Endocr J.* marzo de 2008;55(1):23-31.
 136. Schattke S, Knebel F, Grohmann A, Dreger H, Kmezik F, Riemekasten G, et al. Early right ventricular systolic dysfunction in patients with systemic sclerosis without pulmonary hypertension: a Doppler Tissue and Speckle Tracking echocardiography study. *Cardiovasc Ultrasound.* 22 de enero de 2010;8:3.
 137. Ky B, Shults J, Keane MG, Sutton MStJ, Wolf M, Feldman HI, et al. FGF23 Modifies the Relationship Between Vitamin D and Cardiac Remodeling. *Circ*

- Heart Fail. julio de 2013;6(4):817-24.
138. Yuen SY, Rochweg B, Ouimet J, Pope JE. Patients with scleroderma may have increased risk of osteoporosis. A comparison to rheumatoid arthritis and noninflammatory musculoskeletal conditions. *J Rheumatol.* junio de 2008;35(6):1073-8.
 139. Neumann K, Wallace DJ, Metzger AL. Osteoporosis--less than expected in patients with scleroderma? *J Rheumatol.* julio de 2000;27(7):1822-3.
 140. Sampaio-Barros PD, Costa-Paiva L, Filardi S, Sachetto Z, Samara AM, Marques-Neto JF. Prognostic factors of low bone mineral density in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* abril de 2005;23(2):180-4.
 141. Alexandersson BT, Geirsson AJ, Olafsson I, Franzson L, Sigurdsson G, Gudbjornsson B. [Bone mineral density and bone turnover in systemic sclerosis]. *Laeknabladid.* agosto de 2007;93(7-8):535-41.
 142. Coulson J, Bagley L, Barnouin Y, Bradburn S, Butler-Browne G, Gapeyeva H, et al. Circulating levels of dickkopf-1, osteoprotegerin and sclerostin are higher in old compared with young men and women and positively associated with whole-body bone mineral density in older adults. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* septiembre de 2017;28(9):2683-9.
 143. Isakova T, Cai X, Lee J, Katz R, Cauley JA, Fried LF, et al. Associations of FGF23 With Change in Bone Mineral Density and Fracture Risk in Older Individuals. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* abril de 2016;31(4):742-8.
 144. Black DM, Rosen CJ. Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med.* 21 de enero de 2016;374(3):254-62.
 145. Kanis JA, Oden A, Johnell O, Johansson H, De Laet C, Brown J, et al. The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* agosto de 2007;18(8):1033-46.
 146. Kanda E, Yoshida M, Sasaki S. Applicability of fibroblast growth factor 23 for evaluation of risk of vertebral fracture and chronic kidney disease-mineral bone disease in elderly chronic kidney disease patients. *BMC Nephrol.* 26 de septiembre de 2012;13:122.
 147. Ramli FF, Chin KY. A Review of the Potential Application of Osteocyte-Related Biomarkers, Fibroblast Growth Factor-23, Sclerostin, and Dickkopf-1 in Predicting Osteoporosis and Fractures. *Diagn Basel Switz.* 6 de marzo de 2020;10(3):E145.
 148. Quarles LD. Fibroblast growth factor 23 and α -Klotho co-dependent and

- independent functions. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* enero de 2019;28(1):16-25.
149. Dalton GD, Xie J, An SW, Huang CL. New Insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. *Front Endocrinol.* 2017;8:323.
 150. Lim K, Groen A, Molostvov G, Lu T, Lilley KS, Snead D, et al. α -Klotho Expression in Human Tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* octubre de 2015;100(10):E1308-1318.
 151. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, et al. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation.* 13 de abril de 2004;109(14):1776-82.
 152. Hu MC, Shi M, Zhang J, Addo T, Cho HJ, Barker SL, et al. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating α Klotho. *J Am Soc Nephrol JASN.* enero de 2016;27(1):79-90.
 153. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Kida I, et al. Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. *Endocrine.* junio de 2009;35(3):341-6.
 154. Talotta R, Bongiovanni S, Letizia T, Rigamonti F, Atzeni F, Benucci M, et al. The role of klotho in systemic sclerosis. *Reumatismo.* 21 de diciembre de 2017;69(4):156-63.
 155. Talotta R, Bongiovanni S, Letizia T, Rigamonti F, Ditto MC, Atzeni F, et al. Measurement of Serum Klotho in Systemic Sclerosis. *Dis Markers.* 2017;2017:1-7.
 156. Talotta R, Rigamonti F, Letizia T, Bongiovanni S, Ditto MC, Antivalle M, et al. Serum klotho concentrations inversely correlate with the severity of nailfold capillaroscopic patterns in patients with systemic sclerosis. *Reumatismo.* 1 de abril de 2019;71(1):19-23.
 157. Haack M, Sanchez E, Mullington JM. Elevated inflammatory markers in response to prolonged sleep restriction are associated with increased pain experience in healthy volunteers. *Sleep.* septiembre de 2007;30(9):1145-52.
 158. Xie J, Cha SK, An SW, Kuro-O M, Birnbaumer L, Huang CL. Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. *Nat Commun.* 2012;3:1238.
 159. Kusaba T, Okigaki M, Matui A, Murakami M, Ishikawa K, Kimura T, et al. Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca^{2+} channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 de noviembre de 2010;107(45):19308-13.

160. Wu YL, Xie J, An SW, Oliver N, Barrezueta NX, Lin MH, et al. Inhibition of TRPC6 channels ameliorates renal fibrosis and contributes to renal protection by soluble klotho. *Kidney Int.* abril de 2017;91(4):830-41.
161. Song S, Gao P, Xiao H, Xu Y, Si LY, Si LY. Klotho suppresses cardiomyocyte apoptosis in mice with stress-induced cardiac injury via downregulation of endoplasmic reticulum stress. *PLoS One.* 2013;8(12):e82968.
162. Yang K, Wang C, Nie L, Zhao X, Gu J, Guan X, et al. Klotho Protects Against Indoxyl Sulphate-Induced Myocardial Hypertrophy. *J Am Soc Nephrol JASN.* octubre de 2015;26(10):2434-46.
163. Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, et al. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 24 de septiembre de 2000;276(2):767-72.
164. Yamagishi T, Saito Y, Nakamura T, Takeda S, Kanai H, Sumino H, et al. Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens.* noviembre de 2001;24(6):705-9.
165. Arking DE, Atzmon G, Arking A, Barzilai N, Dietz HC. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ Res.* 4 de marzo de 2005;96(4):412-8.
166. Okamoto Y, Fujita S, Ichi, Morita H, Kizawa S, Ito T, Sakane K, et al. Association between circulating FGF23, α -Klotho, and left ventricular diastolic dysfunction among patients with preserved ejection fraction. *Heart Vessels.* enero de 2016;31(1):66-73.
167. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science.* 16 de septiembre de 2005;309(5742):1829-33.
168. Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, et al. α -Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science.* 15 de junio de 2007;316(5831):1615-8.
169. Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, et al. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem.* 12 de marzo de 2004;279(11):9777-84.
170. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science.* 21 de octubre de 2005;310(5747):490-3.
171. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH

- increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol.* octubre de 2010;299(4):F882-889.
172. Kuro-o M. Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* julio de 2006;15(4):437-41.
 173. Chalhoub D, Marques E, Meirelles O, Semba RD, Ferrucci L, Satterfield S, et al. Association of Serum Klotho with Loss of Bone Mineral Density and Fracture Risk in Older Adults. *J Am Geriatr Soc.* diciembre de 2016;64(12):e304-8.
 174. Bassyouni IH, Gheita TA, Talaat RM. Clinical significance of serum levels of sCD36 in patients with systemic sclerosis: preliminary data. *Rheumatol Oxf Engl.* noviembre de 2011;50(11):2108-12.
 175. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, Rajkumar VS, Pantelides P, Xu SW, et al. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol.* septiembre de 1997;151(3):831-41.
 176. Allanore Y, Meune C. N-terminal pro brain natriuretic peptide: the new cornerstone of cardiovascular assessment in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* junio de 2009;27(3 Suppl 54):59-63.
 177. Blacher J, Asmar R, Djane S, London GM, Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertens Dallas Tex* 1979. mayo de 1999;33(5):1111-7.
 178. McEniery CM, Qasem A, Schmitt M, Avolio AP, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo. *J Am Coll Cardiol.* 3 de diciembre de 2003;42(11):1975-81.
 179. Heintz B, Dörr R, Gillissen T, Walkenhorst F, Krebs W, Hanrath P, et al. Do arterial endothelin 1 levels affect local arterial stiffness? *Am Heart J.* octubre de 1993;126(4):987-9.
 180. Browatzki M, Schmidt J, Kübler W, Kranzhöfer R. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* abril de 2000;95(2):98-105.
 181. Kundi H, Kiziltunc E, Ates I, Cetin M, Barca AN, Ozkayar N, et al. Association between plasma homocysteine levels and end-organ damage in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients. *Endocr Res.* febrero de 2017;42(1):36-41.
 182. Yeh JK, Chen CC, Hsieh MJ, Tsai ML, Yang CH, Chen DY, et al. Impact of Homocysteine Level on Long-term Cardiovascular Outcomes in Patients

- after Coronary Artery Stenting. *J Atheroscler Thromb.* 2017;24(7):696-705.
183. Lai WKC, Kan MY. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Ann Nutr Metab.* 2015;67(1):1-12.
 184. Caramaschi P, Martinelli N, Biasi D, Carletto A, Faccini G, Volpe A, et al. Homocysteine plasma concentration is related to severity of lung impairment in scleroderma. *J Rheumatol.* febrero de 2003;30(2):298-304.
 185. Motegi SI, Toki S, Yamada K, Uchiyama A, Ishikawa O. Elevated plasma homocysteine level is possibly associated with skin sclerosis in a series of Japanese patients with systemic sclerosis. *J Dermatol.* noviembre de 2014;41(11):986-91.
 186. Washio T, Nomoto K, Watanabe I, Tani S, Nagao K, Hirayama A. Relationship between plasma homocysteine levels and congestive heart failure in patients with acute myocardial infarction. *Homocysteine and congestive heart failure. Int Heart J.* 2011;52(4):224-8.
 187. Mahmud A, Feely J. Effect of smoking on arterial stiffness and pulse pressure amplification. *Hypertens Dallas Tex* 1979. enero de 2003;41(1):183-7.
 188. Ong KT, Delorme S, Pannier B, Safar ME, Benetos A, Laurent S, et al. Aortic stiffness is reduced beyond blood pressure lowering by short-term and long-term antihypertensive treatment: a meta-analysis of individual data in 294 patients. *J Hypertens.* junio de 2011;29(6):1034-42.
 189. Levy BI, Benessiano J, Poitevin P, Safar ME. Endothelium-dependent mechanical properties of the carotid artery in WKY and SHR. Role of angiotensin converting enzyme inhibition. *Circ Res.* febrero de 1990;66(2):321-8.
 190. Samouillan V, Lamy E, Dandurand J, Foucault-Bertaud A, Chareyre C, Lacabanne C, et al. Changes in the physical structure and chain dynamics of elastin network in homocysteine-cultured arteries. *J Biomed Mater Res A.* mayo de 2010;93(2):696-703.
 191. Feng SQ, Ye P, Luo LM, Xiao WK, Bai YY, Feng D, et al. Associations of plasma homocysteine and high-sensitivity C-reactive protein levels with arterial stiffness in Chinese population: a community-based study. *Chin Med J (Engl).* enero de 2012;125(1):44-9.
 192. Zhang S, Bai YY, Luo LM, Xiao WK, Wu HM, Ye P. Association between serum homocysteine and arterial stiffness in elderly: a community-based study. *J Geriatr Cardiol JGC.* marzo de 2014;11(1):32-8.
 193. Xiao W, Bai Y, Ye P, Luo L, Liu D, Wu H, et al. Plasma homocysteine is associated with aortic arterial stiffness but not wave reflection in Chinese hypertensive subjects. *PloS One.* 2014;9(1):e85938.

194. Sabio JM, Vargas-Hitos JA, Martinez-Bordonado J, Navarrete-Navarrete N, Díaz-Chamorro A, Olvera-Porcel C, et al. Relationship between homocysteine levels and hypertension in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res.* octubre de 2014;66(10):1528-35.
195. Ix JH, Chonchol M, Laughlin GA, Shlipak MG, Whooley MA. Relation of sex and estrogen therapy to serum fibroblast growth factor 23, serum phosphorus, and urine phosphorus: the Heart and Soul Study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* noviembre de 2011;58(5):737-45.

XII.ANEXOS.

ANEXO 1. ABREVIATURAS.

- ACR: American College of Rheumatology
- Aix75: Índice de aumento corregido por frecuencia cardiaca.
- ANA: Anticuerpos antinucleares
- AAC: Anticuerpo anticentrómero
- AR: artritis reumatoide
- ARA II: Antagonistas de los receptores de angiotensina II
- ATS: Aterosclerosis
- BNP: Péptido cerebral natriurético
- CXCL4: Ligando de las chemokinas 4
- CF-VOP: VOP carotido-femoral
- CTFG: factor de crecimiento del tejido conectivo
- CV: Cardiovascular
- CVF: Capacidad vital forzada
- CA: Calcioantagonistas.
- CO: Monóxido de carbono
- DE: Desviación estandar
- DM: Diabetes Mellitus
- DiamAI: diámetro de la aurícula izquierda diámetro diastólico del VI
- DiamDVI: diámetro diastólico del VI diámetro sistólico del VI
- DiamSVI: diámetro sistólico del VI
- Diamsepto: diámetro de septo interventricular
- DMO: densitometría ósea

- EA: relación onda E/A
- ECG: Electrocardiograma
- ECV: Enfermedad cardiovascular
- eGFR: filtrado glomerular
- ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- ERC: Enfermedad renal crónica
- ES: Esclerosis sistémica
- ESD: Esclerosis sistémica Difusa
- ESL: Esclerosis sistémica Limitada
- ESse: Esclerosis sistémica sine esclerodermia
- EPI: Enfermedad pulmonar intersticial
- ET-1: Endotelina-1
- EULAR: European League Against Rheumatism
- IECAs: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
- FC: Frecuencia cardiaca.
- FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo.
- FGF: Fibroblast growth factor
- FGF-2: Fibroblast growth factor 2
- FGF-23: Fibroblast growth factor 23
- FGFR-1: receptor 1 de FGF
- FRCV: factores de riesgo cardiovascular
- GIMC: grosor íntima-media carotídea.
- GrosorPP: grosor pared posterior
- GWAS: estudios de asociación del genoma completo.
- HAP: hipertensión arteria pulmonar
- HDL: Colesterol HDL (High density lipoprotein)

- HF: fractura de cadera.
- HLA: Antígeno leucocitario humano.
- HTA: Hipertensión arterial
- HTP: Hipertensión pulmonar
- HVI: Hipertrofia del ventrículo izquierdo
- IAM: Infarto agudo de miocardio
- ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1
- IECAs: Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina
- IL: interleuquina
- IL-1: Interleuquina 1
- IL-4: interleuquina 4
- IL-6: Interleuquina 6
- IMC: Índice de masa corporal
- ITB: Índice tobillo-brazo.
- LES: lupus eritematoso sistémico.
- LDL-colesterol: Low density lipoprotein
- mKlotho: fracción transmembrana de Klotho
- MOF: Fractura osteoporótica mayor
- NINE: neumopatía intersticial inespecífica
- NIU: neumopatía intersticial usual
- PA: Presión arterial
- PAM: Presión arterial media
- PAPs: presión estimada de la arteria pulmonar
- PP: Presión de pulso.
- PCR: Proteína C reactiva
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

- PreES: Preesclerodermia
- Pro-BNP: propéptido natriurético cerebral
- PTH: Parathormona
- QT: intervalo QT
- QTc: intervalo QT corregido
- RCV: Riesgo cardiovascular
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- RVD: Receptor de la vitamina D
- SCL-70: anticuerpos antipoisomera I
- sKlotho: fracción soluble de Klotho
- SPSS: Statistical Package for the Social Science
- TAD: Tensión arterial diastólica
- TAM: Tensión arterial media
- TAS: Tensión arterial sistólica
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- TRPC6: transient receptor potential canonical 6
- VOP: Velocidad onda del pulso.
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
- VI: Ventrículo izquierdo.
- VSG: Velocidad de sedimentación globular
- 1,25(OH)₂ D₃: 1,25-dihidroxi vitamina D
- 25(OH) D: 25-hidroxi vitamina D

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Es muy importante que lea atentamente esta hoja, en la que se le proporciona información detallada sobre el estudio y en la que se le solicita oficialmente su participación.

TÍTULO DEL ESTUDIO

“Estudio de FGF-23 y Klotho en pacientes con esclerosis sistémica”

Este estudio tiene como objetivo fundamental profundizar en el conocimiento de los mecanismos por los que los pacientes con esclerosis sistémica tienen un riesgo mayor de padecer una enfermedad cardiovascular que la población general.

Este estudio consiste en la realización de una historia clínica completa en la que se le interrogará acerca de sus enfermedades, hábitos de salud y tratamientos, así como distinta sintomatología en relación con esta patología. Se le realizará una exploración física básica (neuroológica básica, cardiorrespiratoria, abdominal, de miembros, adenopatías...), con cuantificación de peso, talla y perímetro de cintura abdominal. Se determinará la presión arterial (en varias determinaciones en ambos miembros superiores e inferiores para determinar un índice de arterioesclerosis) y la frecuencia cardíaca. Además se realizará un electrocardiograma (ECG). Además se le realizará una técnica denominada velocidad de onda de pulso para ver el grado de rigidez arterial (y por lo tanto de arteriosclerosis) que tiene el paciente. Otras pruebas complementarias que comprende el estudio son una Ecocardiografía y una densitometría ósea. Todas estas técnicas son sencillas, no invasivas e indoloras pero aportan una información primordial para nuestro estudio. Por último se realizará una extracción de sangre mediante venopunción, y se obtendrán dos muestras diferentes una para el laboratorio general y otra para las moléculas que queremos estudiar en este caso. Para esta última muestra se enviará un tubo a un laboratorio diferente, para lo cual la paciente deberá dar su consentimiento expresamente.

Toda la información obtenida como resultado de este proyecto de investigación será considerada CONFIDENCIAL. Los resultados se comunicarán en la comunidad científica (congresos, publicaciones, etc.), preservando en todo caso la

confidencialidad de la información de cada paciente, de modo que no se mencionará ningún dato que pudiera llevar a identificarlo.

La participación en este estudio NO SUPONE NINGÚN RIESGO POTENCIAL para el participante. Su participación es totalmente VOLUNTARIA y, en caso de tomar parte en el mismo, es libre de abandonarlo o pedir que sean retirados tanto los resultados como las muestras en el momento en que desee. La negativa a participar en este estudio NO tiene ninguna repercusión sobre la atención médica. Para participar en este estudio y que se pueda emplear la información expuesta anteriormente en esta investigación es necesaria su aprobación mediante firma del correspondiente Consentimiento Informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO

“Estudio de FGF-23 y Klotho en pacientes con esclerosis sistémica”

Yo.....
..... (Nombre y Apellidos del Participante), siendo informado por el
Dr:.....(Nombre y
Apellidos del Investigador),

- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He leído la hoja de información del estudio.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.

Igualmente, comprendo que:

- Mi participación es completamente voluntaria.
- Puedo retirarme del estudio:
 - Cuando quiera.
 - Sin tener que dar explicaciones.
 - Sin que ello repercuta en mi asistencia médica en un futuro.

Por todo ello, expreso mi conformidad y para participar en el estudio.

Firma del Participante

Fecha: ___/___/___

Firma del Investigador

Fecha: ___/___/___

ANEXO 3. COPIA INTEGRAL DEL TRABAJO CIENTÍFICO PUBLICADO.

Association between homocysteine levels and arterial stiffness in women with systemic sclerosis

A. Álvarez-Cienfuegos¹, L. Cantero-Nieto², J.A. García-Gómez³, J.M. Sabio⁴, M.A. González-Gay⁵⁻⁷, N. Ortego-Centeno⁸⁻¹⁰

¹Department of Rheumatology, Hospital Vega-Baja, Alicante, Spain;

²Department of Emergency, Hospital Santa Ana, Granada, Spain;

³Infectious Diseases Unit, Hospital General de Elche, Alicante, Spain;

⁴Systemic Autoimmune Diseases Unit, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain;

⁵Epidemiology, Genetics and Atherosclerosis Research Group on Systemic Inflammatory Diseases, Rheumatology Division, IDIVAL, Santander, Spain;

⁶School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain;

⁷Cardiovascular Pathophysiology and Genomics Research Unit, School of Physiology, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa;

⁸Systemic Autoimmune Diseases Unit, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain;

⁹School of Medicine, University of Granada, Spain;

¹⁰Instituto de Investigación Biosanitaria, IBS, Granada, Spain.

Antonio Alvarez-Cienfuegos, MD, PhD
Lucía Cantero-Nieto, MD

Jose Alberto Garcia-Gomez, PhD

Jose Mario Sabio, MD, PhD

Miguel A. González-Gay, MD, PhD

Norberto Ortego-Centeno, MD, PhD

Please address correspondence to:

Antonio Alvarez de Cienfuegos,

Department of Rheumatology,

Hospital Vega-Baja,

Ctra. Orihuela-Almoradí, s/n,

03314 Orihuela (Alicante), Spain.

E-mail: antonioalvarezdc@gmail.com

Received on May 22, 2020; accepted in revised form on July 21, 2020.

Clin Exp Rheumatol 2020; 38 (Suppl. 125): S92-S97.

© Copyright CLINICAL AND

EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2020.

Key words: homocysteine, systemic sclerosis, pulse wave velocity, brain natriuretic peptide, arterial stiffness

Competing interests: see page S-96.

ABSTRACT

Objective. The purpose of this study was to evaluate homocysteine (Hcy) serum levels in women with systemic sclerosis (SSc) compared with healthy controls and to examine possible associations between Hcy and markers of arterial stiffness.

Methods. A cross-sectional study was performed at a single hospital between November 2017 and May 2019: 62 women with SSc and 62 age- and sex-matched healthy controls were enrolled. Pulse wave velocity (PWV) was measured non-invasively along the carotid-femoral arterial segment. Serum Hcy was analysed using immunonephelometric method.

Results. There was a significant difference in Hcy serum levels between SSc female patients and healthy controls (11.9±3.3 vs. 10.3±2.3 µmol/ml, $p=0.002$). Serum levels of Hcy were positively correlated with PWV ($r=0.28$, $p<0.05$), brain natriuretic peptide (BNP) ($r=0.36$, $p<0.05$) and disease duration ($r=0.38$, $p<0.05$), within the SSc group. In addition, in the linear regression model, higher Hcy concentrations were associated with higher PWV [$\beta=0.74$ 95% CI (0.085, 1.394); $p=0.027$], BNP [$\beta=0.04$ 95% CI (0.014, 0.072); $p=0.004$] and disease duration [$\beta=0.18$ 95% CI (0.070, 0.300); $p=0.002$]. In multiple linear regression model adjusting for covariants, Hcy remained positively related to the PWV [$\beta=0.033$ 95% CI (0.003, 0.062); $p=0.031$].

Conclusion. Our findings revealed a positive correlation between Hcy serum levels and PWV, which indicates that high levels of Hcy may predispose to the development of vascular stiffness in patients with SSc.

Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a multisystemic disease featured by microvascu-

lar and immunological disorders along with an excessive accumulation of the components of the connective tissue (collagen, fibronectin, glycosaminoglycans, proteoglycans) that cause cutaneous sclerosis and fibrosis of different organs (1). Vascular involvement in SSc is thought to be the result of immune inflammatory processes that activate and injure the vascular endothelium (2). Such immune vascular injury could increase the risk of arteriopathy. Homocysteine (Hcy), a nonessential sulfur-containing amino acid, is derived from methionine (3). It is formed during the conversion of methionine to cysteine. Several studies have reported that serum Hcy levels are elevated in SSc patients compared to healthy controls (4-7). Elevated Hcy has been shown to be a moderately strong and independent cardiovascular risk factor in healthy populations (8). This association appears to be particularly strong in older people, in which the level of Hcy has even been shown to be a better predictor of cardiovascular mortality than models based on classic Framingham risk factors (age, gender, total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, smoking habits, and systolic blood pressure) (9). Hcy also has been associated with arterial stiffness (10). Arterial stiffness can reflect arterial elasticity and the burden of arteriosclerosis (11). Pulse wave velocity (PWV) is regarded as the gold standard measurement of large artery stiffness and is one of the markers of hypertension-mediated organ damage, and should be assessed among patients with hypertension according to the guidelines of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC) (12). Previous meta-analyses have revealed that PWV is an independent predictor of the development of cardiovascular

disease (CVD), adverse cardiovascular events and all-cause mortality (13-15). At present, PWV is widely used in both clinical practice and epidemiological studies due to its feasibility and clinical significance.

The purpose of this study was to analyse Hcy in a cohort of women with SSc and to investigate possible associations between Hcy serum levels with markers of arterial stiffness.

Materials and methods

Study subjects

This cross-sectional study was performed at San Cecilio Hospital, Granada, Spain, from November 2017 to May 2019. We prospectively enrolled 62 consecutive female patients affected by SSc ≥ 18 years old attending our Systemic Autoimmune Diseases Unit. In addition, a control group of 62 healthy women age-matched, recruited mainly among non-medical staff of our hospital that attended their annual medical health examination and who were invited to participate were included. All patients included in this study had normal serum creatinine (Cr) levels, and met the 2013 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) criteria for SSc (16). Individuals with prevalent cardiovascular disease (acute myocardial infarction, angina pectoris, stroke, or peripheral arterial disease) were excluded.

At the clinic visit, participants completed questionnaires about their lifestyle characteristics, medical history, and current medication used. Informed consent was obtained for all subjects, and the study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital Clínico Universitario San Cecilio in Granada, Spain, and conducted in accordance with the guidelines in the Declaration of Helsinki.

Cardiovascular assessment

Current smokers were defined as those who reported having smoked ≥ 1 cigarette per day regularly during the year preceding the examination. Waist circumference, weight, and height were measured; and body mass index (BMI) was calculated as weight (kg)/height

(m^2). Two recordings of blood pressure were obtained from the right arm of the seated subjects; measurements were taken in 5-min intervals, then mean values were calculated. Hypertension was defined as a mean of 3 independent measures of blood pressure $\geq 140/90$ mmHg or current use of antihypertensive drugs. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) was defined by self-reported use of insulin, or oral hypoglycaemic medications, or a fasting glucose level ≥ 126 mg/dl. Kidney function was assessed using the estimated glomerular filtration rate (eGFR) calculated by the CKD-Epi study equation (17).

In our study, we assessed arterial stiffness by determining carotid-femoral pulse wave velocity (CFPWV), as previously described (18). Briefly, after 15–20 min in a supine posture, we measured brachial blood pressure and arterial tonometry with an electrocardiogram obtained from the carotid and femoral arteries using a custom transducer (Cardiovascular Engineering, Inc.) (18). Transit distance from the carotid to femoral arteries was assessed with body surface measurements from the suprasternal notch to the carotid and femoral pulse recording sites. We computed CFPWV as the pulse wave transit distance divided by the transit time of the pulse wave from the carotid to femoral arteries, with adjustment for parallel transmission of the arterial pulse wave in the brachiocephalic artery and aortic arch (18). Higher CFPWV indicates greater arterial stiffness.

Laboratory measurements

In all the cases, a fasting blood sample was taken in the morning, and was stored at -70°C until the assays were performed.

The sera were tested for creatinine, CRP, BNP and Hcy. Creatinine was determined by Jaffe method (Siemens Healthcare Diagnostic Inc. NY, USA). CRP was measured by turbidimetric immunoassay (Siemens Healthcare Diagnostic Inc. NY, USA). BNP was quantified in heparinised plasma using a solid-phase two-site chemiluminescent immunometric assay (Biométrieux, France). Serum Hcy (Siemens Healthcare Diagnostic Inc. NY, USA)

were measured by immunonephelometric method according to the manufacturer's recommendations. Antinuclear antibodies were assessed using ELISA kits produced by Generic Assay Dahlwitz Germany. Fasting plasma glucose was measured in fresh specimens with a hexokinase reagent kit (Siemens Healthcare Diagnostic Inc. NY, USA). Total cholesterol and triglyceride levels were determined by fully enzymatic techniques. High-density lipoprotein (HDL) was determined after precipitation of apolipoprotein B (apoB)-containing lipoproteins with magnesium sulphate and dextran sulphate. Low-density lipoprotein (LDL) was calculated using the Friedewald formula. All other routine serum biochemical parameters were measured at the Department of Clinical Chemistry, San Cecilio Hospital.

Statistical analysis

Data were analysed by statistical software SPSS 21 (Chicago, IL, USA), using independent samples *t*-test, Mann-Whitney U-test, and Chi-square test when appropriate. Spearman's coefficient and Pearson's correlation were calculated as suitable to determine the correlation between the bio-chemical parameters, these correlation coefficients are statistical measures of the strength of a monotonic relationship between paired data and that correlation does not imply causation. The correlation between the two variables is denoted by the letter *r* and quantified with a number, which varies between -1 and $+1$. Zero means there is no correlation, where 1 means a complete or perfect correlation. The sign of the *r* shows the direction of the correlation. A negative *r* means that the variables are inversely related. The strength of the correlation increases both from 0 to $+1$, and 0 to -1 , using the following interpretation: 0.00–0.19 is "very weak", 0.20–0.39 is "weak", 0.40–0.59 is "moderate", 0.60–0.79 is "strong" and 0.80–1 is "very strong". *P*-values of less than 0.05 were considered statistically significant. Sample size was estimated for a 0.05% alpha risk. The quantitative data were shown as mean \pm standard deviation (SD) and median

(Q1–Q3) as suitable. To test if we can admit that the distribution is normal, we use the Shapiro-Wilk test. Linear regression was used to examine the cross-sectional associations of serum Hcy concentrations with PWV, BNP and disease duration. Multiple regression analysis was performed to determine the relationship between PWV, age, smoking, BMI, blood pressure, as well as serum levels of Hcy, HDL-c and glucose.

Results

Characteristics of the study subjects

The main features of the 62 women with SSc and 62 controls included in this study are shown in Table I. The mean age (SD) of the patients was 53.2±10.1 years. The majority were Caucasian (90.5%). The mean disease duration was 8.8±6.9 years. Forty-four (70.9%) patients had a limited form of the disease, 11 (17.7%) had a diffuse form, and 7 (11.3%) had SSc without skin involvement. Twelve (19%) patients had calcinosis and all patients had Raynaud Phenomenon. Three patients were treated with methotrexate. In addition, a total of 62 healthy women were included in our study as controls; mean age (SD) 52.7±9.7 years. Most of them were also Caucasian (98.3%).

Laboratory results

Laboratory tests of the patients and healthy controls included in the present study are shown in Table II. The mean CRP, ESR and BNP in SSc patients were 0.4±0.4 mg/dl, 21.1±16.0 mm/1st hour, and 41.2±27.5 pg/ml, respectively.

Antinuclear antibodies (ANAs) were detected in 54 patients (87.1%), anti-centromere antibodies in 34 patients (54.8%), anti-Scl-70 antibodies in 6 patients (9.6%), and anti-RNA-polymerase III antibodies in 4 patients (6.4%). Serum Hcy concentrations were significantly higher in the SSc patients than those in the control group: [11.9±3.3 vs. 10.3±2.3, µmol/l; $p=0.002$] (Fig. 1).

Cardiovascular disease risk factors

As shown in Table I, patients had a mean BMI of 26.3±4.9 kg/m², waist circumference of 83.5±11.0 cm and

Table I. Characteristics of women with systemic sclerosis and healthy controls.

	SSc mean ± SD	HC mean ± SD	p-value
Age, years	53.2 ± 10.1	52.7 ± 9.7	0.71
Height, cm	159.5 ± 5.6	160.9 ± 7.1	0.23
Body weight, kg	66.8 ± 12.0	67.2 ± 12.0	0.90
Body mass index, kg/m ²	26.3 ± 4.9	25.9 ± 4.3	0.90
Waist circumference, cm	83.5 ± 11.0	83.1 ± 13.4	0.64
PWV, m/s	7.5 ± 1.2	7.3 ± 1.4	0.53
Current smokers, n (%)	11 (17.7)	15 (24.2)	0.04
Hypertension, n (%)	8 (12.9)	11 (17.7)	0.87
Angiotensin II receptor blockers, n (%)	5 (8.1)	5 (8.1)	1
ACE inhibitors, n (%)	2 (3.2)	3 (4.8)	1
Diuretics, n (%)	1 (1.6)	2 (3.2)	1
Calcium-channel blockers, n (%)	20 (32.2)	1 (1.6)	<0.001
Diabetes mellitus, n (%)	2 (3.2)	2 (3.2)	0.62
Dyslipidemia, n (%)	21 (33.8)	14 (22.5)	0.17
Prednisone, mg/day	6.5 ± 3.5	-	-
Methotrexate, n (%)	3 (4.8)	-	-
Disease duration, year	8.8 ± 6.9	-	-
lcSSc, n (%)	44 (70.9)	-	-
dcSSc, n (%)	11 (17.7)	-	-
SSc without skin involvement	7 (11.3)	-	-

ACE: angiotensin-converting enzyme; dcSSc: diffuse cutaneous SSc; HC: healthy control; lcSSc: limited cutaneous SSc; PWV: pulse wave velocity; SD: standard deviation; SSc: systemic sclerosis.

Table II. Serum Hcy and biochemistry of the patients and healthy controls.

	SSc mean ± SD	HC mean ± SD	p-value
Hcy, µmol/l	11.9 ± 3.3	10.3 ± 2.3	0.002
Serum phosphate, mg/dl	3.6 ± 0.5	3.4 ± 0.5	0.04
Serum calcium, mg/dl	9.5 ± 0.3	9.4 ± 0.4	0.05
Glucose, mg/dl	88.4 ± 9.4	92.1 ± 13.0	0.07
Cholesterol, mg/dl	199.8 ± 34.9	211.8 ± 37.3	0.06
LDL-C, mg/dl	122.1 ± 32.0	129.7 ± 30.7	0.17
HDL-C, mg/dl	57.8 ± 15.5	63.3 ± 13.1	0.03
Triglycerides, mg/dl	105.2 ± 54.1	107.7 ± 53.9	0.79
Uric acid, mg/dl	4.6 ± 1.1	4.6 ± 1.3	0.91
BNP, pg/ml	41.2 ± 27.5	28.3 ± 19.9	0.003
Serum creatinine, mg/dl	0.7 ± 0.8	0.7 ± 0.2	0.12
eGFR, ml/min	93.0 ± 17.2	97.0 ± 13.2	0.19
CRP, mg/dl	0.4 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.007
ESR, mm/h	21.1 ± 16.0	11.3 ± 10.2	0.001
ANAs, n (%)	54 (87.1)	-	-
Anti-centromere, n (%)	34 (54.8)	-	-
Anti-Scl70, n (%)	6 (9.6)	-	-
Anti-RNA-polymerase III, n (%)	4 (6.4)	-	-

ANA: antinuclear antibodies; BNP: brain natriuretic peptide; CRP: C-reactive protein; eGFR: estimated glomerular filtration rate; ESR: erythrocyte sedimentation rate; HC: healthy control; HDL: high-density lipoprotein; Hcy: homocysteine; LDL: low-density lipoprotein; SD: standard deviation; SSc: systemic sclerosis.

PWV of 7.5±1.2 m/s. Eleven (17.7%) of them are current smokers. Two patients (3.2%) had diabetes mellitus. Healthy controls had a mean BMI of 25.9±4.3 kg/m², waist circumference of 83.1±13.4 cm and PWV of 7.3±1.4 m/s. Fifteen (24.2%) of them are current smokers. Two controls (3.2%) had diabetes mellitus.

Association between Hcy levels and cardiovascular risk factors or disease features in patients with SSc
Table III shows the correlation coefficients between Hcy and other markers in patients with SSc. Hcy serum levels showed a statistically significant positive weak correlation with PWV ($r=0.28$, $p=0.02$), BNP ($r=0.36$, $p=0.004$) and

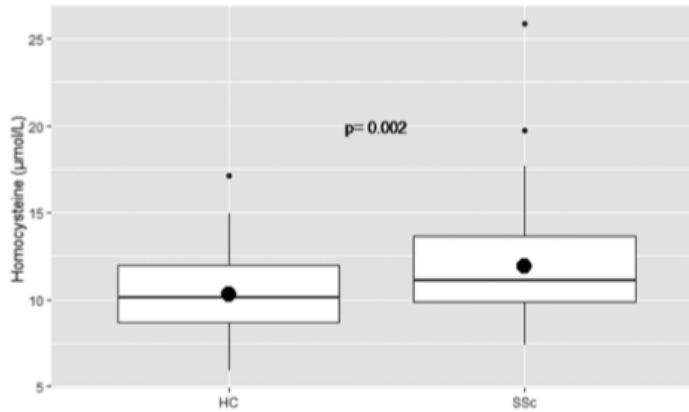


Fig. 1. Median serum concentration of homocysteine in systemic sclerosis (SSc) patients and healthy controls (HC). 2-tailed Mann Whitney U-test for unpaired sample.

Table III. Correlations between Hcy and study parameters in SSc patients.

	Correlation coefficient	p-value
Age	0.24	0.054
Height	-0.07	0.614
Body weight	0.04	0.745
Body mass index	0.08	0.559
Waist circumference	0.04	0.764
Hypertension	0.08	0.543
Smoking	0.17	0.189
Disease duration	0.38	0.002
PWV	0.28	0.027
Prednisone dose	-0.03	0.690
Methotrexate	-0.08	0.374
C-reactive protein	0.18	0.155
Erythrocyte sedimentation rate	0.05	0.721
Serum creatinine	0.38	0.002
Serum urea	0.35	0.005
eGFR	-0.3	0.007
Serum phosphate	0.18	0.165
Serum calcium	0.09	0.507
Glucose	-0.20	0.127
Cholesterol	0.14	0.283
LDL-C	0.11	0.414
HDL-C	-0.06	0.622
Triglycerides	0.20	0.116
Uric acid	0.19	0.146
BNP	0.36	0.004

BNP: brain natriuretic peptide; eGFR: estimated glomerular filtration rate; HDL: high density lipoprotein; Hcy: homocysteine; LDL: low density lipoprotein; PWV: pulse wave velocity; SSc: systemic sclerosis.

disease duration ($r=0.38$, $p=0.002$). However, there was no correlation of Hcy levels with age, BMI, waist circumference, or smoking status.

In the linear regression model, higher Hcy concentrations were associated with higher PWV [$\beta=0.74$ 95% CI (0.085, 1.394); $p=0.027$], BNP [$\beta=0.04$ 95% CI (0.014, 0.072); $p=0.004$] and disease duration [$\beta=0.18$ 95% CI (0.070, 0.300); $p=0.002$] (Fig. 2).

Multiple linear regression analysis (Table IV) shows the possible influence of age, BMI, current smoking, blood pressure, serum Hcy, HDL-c and glucose levels in predicting PWV.

Discussion

Systemic sclerosis (SSc) is a multisystem disease characterised by vasculopathy and organ fibrosis (19). Cardiovascular complications in SSc include

peripheral vascular disease, cerebrovascular disease, coronary disease and primary myocardial disease (20).

Hyperhomocysteinaemia (HHcy) was recognised as a modifiable independent risk factor for coronary, cerebral and peripheral vascular diseases (21-23), and experimental studies have also suggested that Hcy induces vascular endothelium injury and leads to vascular damage (24). In our study, we found significantly elevated Hcy serum levels in patients with SSc compared with healthy controls, in accordance with several reports (4-7). We also have found higher BNP serum levels in SSc female patients compared to healthy controls. Brain natriuretic peptide (BNP) level assessment has become a strong and well-recognised indicator of the cardiovascular risk in SSc (25). Elshamy *et al.* (26), reported a significant increase in the mean values of serum levels of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in SSc patients compared to controls. Interestingly, we disclosed a significant positive correlation between Hcy serum levels and BNP in our patients with SSc, independent of age. Washio *et al.* (27) found that BNP levels were increased in the high Hcy group in patients with acute myocardial infarction.

Pulse wave velocity (PWV) is a well-validated index of arterial distensibility, large artery stiffness is a powerful and independent predictor of cardiovascular risk (28, 29). In our study, there was no significant difference in PWV between SSc patients and healthy controls that were in agreement with the study of Bartoloni *et al.* (30), this result may be biased by the higher proportion of smokers in the control group or by the higher proportion of patients under calcium-channel blockers treatment (31, 32).

Smooth muscle tone influences the stiffness of the elastic and muscular arteries, and removal of the vascular endothelium modifies large artery mechanics *in vivo* (33, 34), suggesting a degree of functional regulation of large artery stiffness by endothelium-derived vasoactive mediators. In the present study, we report for first time that high Hcy serum levels were positively as-

2. HO M, VEALE D, EASTMOND C, NUKI G, BELCH J: Macrovascular disease and systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 39-43.
3. SELHUB J: Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 217-46.
4. CARAMASCHI P, MARTINELLI N, BIASI D et al.: Homocysteine plasma concentration is related to severity of lung impairment in scleroderma. *J Rheumatol* 2003; 30: 298-304.
5. CARAMASCHI P, CANESTRINI S, MARTINELLI N et al.: Scleroderma patients nailfold videocapillaroscopic patterns are associated with disease subset and disease severity. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 1566-9.
6. KHURMA V, MEYER C, PARK GS et al.: A pilot study of subclinical coronary atherosclerosis in systemic sclerosis: coronary artery calcification in cases and controls. *Arthritis Rheum* 2008; 59: 591-7.
7. MOTEGI S, TOKI S, YAMADA K, UCHIYAMA A, ISHIKAWA O: Elevated plasma homocysteine level is possibly associated with skin sclerosis in a series of Japanese patients with systemic sclerosis. *J Dermatol* 2014; 41: 986-91.
8. HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION: Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288: 2015-22.
9. DE RUILTER W, WESTENDORP RG, ASSENDELFT WJ et al.: Use of Framingham risk score and new biomarkers to predict cardiovascular mortality in older people: population based observational cohort study. *BMJ* 2009; 338: a3083.
10. VAN DIJK SC, SMULDERS YM, ENNEMAN AW et al.: Homocysteine level is associated with aortic stiffness in elderly: cross-sectional results from the B-PROOF study. *J Hypertens* 2013; 31: 952-9.
11. TOMIYAMA H: Arterial stiffness: is this a marker for the current status or future? *J Atheroscler Thromb* 2016; 23: 1026-7.
12. WILLIAMS B, MANCIA G, SPIERING W et al.: 2018 ESC/ESH guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J* 2018; 39: 3021-104.
13. BEN-SHLOMO Y, SPEARS M, BOUSTRED C et al.: Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: an individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63: 636-46.
14. OHKUMA T, NINOMIYA T, TOMIYAMA H et al.: Brachial-Ankle pulse wave velocity and the risk prediction of cardiovascular disease: an individual participant data meta-analysis. *Hypertension* 2017; 69: 1045-52.
15. VLACHOPOULOS C, AZNAOURIDIS K, TEREINTIS-PRINTZIOS D et al.: Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with brachial-ankle elasticity index: a systematic review and meta-analysis. *Hypertension* 2012; 60: 556-62.
16. VAN DEN HOOGEN F, KHANNA D, FRANSEN J et al.: 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1747-55.
17. NATIONAL KIDNEY FOUNDATION: K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: S1-266.
18. MITCHELL GF, VAN BUCHEM MA, SIGURDSSON S et al.: Arterial stiffness, pressure and flow pulsatility and brain structure and function: the Age, Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik study. *Brain* 2011; 134: 3398-407.
19. BARSOTTI S, ORLANDI M, CODULLO V et al.: One year in review 2019: systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2019; 37: (Suppl. 119): S3-14.
20. NGIAN GS, SAHHRAR J, WICKS IP, VAN DORNUM S: Cardiovascular disease in systemic sclerosis – an emerging association? *Arthritis Res Ther* 2011; 13: 237.
21. TAHERAGHDAM AA, DALIRAKBARI N, KHALILI M et al.: Hyperhomocysteinemia, low vitamin B12, and low folic acid: are risk factors of cerebral vascular thrombosis in northwest Iran? *J Res Med Sci* 2016; 21: 16.
22. YEH JK, CHEN CC, HSIEH MJ et al.: Impact of homocysteine level on long-term cardiovascular outcomes in patients after coronary artery stenting. *J Atheroscler Thromb* 2017; 24: 696-705.
23. KUNDI H, KIZILTUNC E, ATEŞ I et al.: Association between plasma homocysteine levels and endorgan damage in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients. *Endocr Res* 2017; 42: 36-41.
24. LAI WK, KAN MY: Homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Ann Nutr Metab* 2015; 67: 1-12.
25. ALLANORE Y, MEUNE C: N-terminal pro brain natriuretic peptide: the new cornerstone of cardiovascular assessment in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27 (Suppl. 54): S59-63.
26. ELSHAMY HA, IBRAHIM SE, FAROUK HM: N-terminal pro-brain natriuretic peptide in systemic sclerosis: new insights. *Eur J Dermatol* 2011; 21: 686-90.
27. WASHIO T, NOMOTO K, WATANABE I, TANI S, NAGAO K, HIRAYAMA A: Relationship between plasma Homocysteine levels and congestive heart failure in patients with acute myocardial infarction. *Int Heart J* 2011; 52: 224-8.
28. BLACHER J, ASMAR R, DJANE S, LONDON GM, SAFAR ME: Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension* 1999; 33: 1111-7.
29. BLACHER J, GUERIN AP, PANNIER B, MARCHAIS SJ, LONDON GM: Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 2001; 38: 938-42.
30. BARTOLONI E, PUCCI G, CANNARILE F et al.: Central hemodynamics and arterial stiffness in systemic sclerosis. *Hypertension* 2016; 68: 1504-11.
31. MAHMUD A, FEELY J: Effect of smoking on arterial stiffness and pulse pressure amplification. *Hypertension* 2003; 41: 183-7.
32. ONG K, DELERME S, PANNIER B et al.: Aortic stiffness is reduced beyond blood pressure lowering by short-term and long-term antihypertensive treatment: a meta-analysis of individual data in 294 patients. *J Hypertens* 2011; 29: 1034-42.
33. LEVY BI, BENESSIANO J, POITEVIN P, SAFAR ME: Endothelium-dependent mechanical properties of the carotid artery in WKY and SHR. Role of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circ Res* 1990; 66: 321-8.
34. BOUTOUYRIE P, BEZIE Y, LACOLLEY P et al.: *In vivo* in vitro comparison of rat abdominal aorta wall viscosity. Influence of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1346-55.
35. SAMOUILLAN V, LAMY E, DANDURAND J et al.: Changes in the physical structure and chain dynamics of elastin network in homocysteinuric arteries. *J Biomed Mater Res A* 2010; 93: 696-703.
36. FENG SQ, YE P, LUO LM et al.: Associations of plasma homocysteine and high-sensitivity C-reactive protein levels with arterial stiffness in Chinese population: a community-based study. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125: 44-9.
37. MAYER O, FILIPOVSKÝ J, DOLEJSOVÁ M et al.: Mild hyperhomocysteinemia is associated with increased aortic stiffness in general population. *J Hum Hypertens* 2006; 20: 267-71.
38. VYSSOULIS G, KARPANOU E, KYVELOU SM et al.: Associations between plasma homocysteine levels, aortic stiffness and wave reflection in patients with arterial hypertension, isolated office hypertension and normotensive controls. *J Hum Hypertens* 2010; 24: 183-9.
39. ZHANG S, BAI YY, LUO LM, XIAO WK, WU HM, YE P: Association between serum homocysteine and arterial stiffness in elderly: a community-based study. *J Geriatr Cardiol* 2014; 11: 32-8.
40. XIAO W, BAI Y, YE P et al.: Plasma homocysteine is associated with aortic arterial stiffness but not wave reflection in chinese hypertensive subjects. *PLoS One* 2014; 9: e85938.
41. SABIO JM, VARGAS-HITOS JA, MARTINEZ-BORDONADO J et al.: Relationship between homocysteine levels and hypertension in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res* 2014; 66: 1528-35.