

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Niveles de interleuquina 17 en sangre periférica en pacientes con Esclerosis Sistémica. Primera descripción en población Colombiana

José Alex Casallas Osorio

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna
Bogotá, Colombia
2017

Niveles de interleuquina 17 en sangre periférica en pacientes con Esclerosis Sistémica. Primera descripción en población Colombiana

José Alex Casallas Osorio

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Reumatología

Director:

Federico Rondón Herrera

Codirector:

Hector José Castellanos Lorduy

Línea de Investigación:

Línea de Investigación: Esclerosis sistémica - Reumatología

Grupo de Investigación:

BIOLOGÍA CELULAR Y AUTOINMUNIDAD. Código Colciencias: COL0157942

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna

Bogotá, Colombia

2017

RESUMEN

La esclerosis sistémica o esclerodermia es una enfermedad caracterizada por la disfunción y daño micro vascular, autoinmunidad y fibrosis. Se encuentra producción y depósito descontrolado de colágeno y otras proteínas en la matriz extracelular por parte de los fibroblastos que se encuentran en la piel, los pulmones, el corazón, el tracto gastrointestinal y muchos otros órganos. La acumulación progresiva del colágeno termina afectando la arquitectura y función del tejido. Aunque se acepta el papel de la disfunción inmune en la patogénesis de la esclerosis sistémica, las vías exactas que la causan no se han descubierto. En los últimos años varios investigadores han documentado un mayor número de células con inmunexpresión de IL-17+ en sangre periférica, en lavado broncoalveolar y en la piel de pacientes con esclerodermia. Lo anterior sugiere que esta citoquina está involucrada en la vía de alteración de la fibrosis en piel y otros órganos, y puede representar una diana terapéutica inmune promisorio. En la actualidad ya existen terapias con diana en esta interleuquina. Conocer los hallazgos del perfil de expresión en nuestra población puede orientar a la realización de nuevas investigaciones no solo descriptivas sino de intervención.

Objetivo:

Es nuestro objetivo determinar los niveles de IL17 en sangre periférica, en un grupo de pacientes adultos con esclerosis sistémica y si se correlaciona con los siguientes resultados clínicos: mRSS (modified Rodnan skin score), puntuación de la condición de Raynaud, capacidad vital forzada, creatinina sérica, presión arterial, tipo de esclerodermia, tiempo de evolución, alteración de órganos internos y patrón de capilaroscopia.

Metodología:

Es un estudio observacional, transversal y descriptivo. La población objeto de estudio son pacientes con diagnóstico de esclerosis sistémica que asisten a consulta externa de reumatología del Hospital Simón Bolívar, atendidos por el grupo de reumatólogos de la Universidad Nacional dentro del convenio docente asistencial vigente. El tipo de muestreo es por conveniencia con el objetivo de recolectar a todos los pacientes que asisten con este diagnóstico y que acepten ingresar al estudio dentro el cronograma.

Resultados esperados:

Mediante el presente estudio se espera disponer de información local y en población colombiana de los niveles de IL-17 en pacientes con esclerosis sistémica y si existe correlación con resultados clínicos validados en SSc. Los resultados del estudio serán publicados como investigación original y producto en revista de la especialidad. Obtener los requisitos para trabajo de grado en la especialidad de reumatología.

Aspectos éticos:

El presente estudio cumple con los requisitos para la investigación en humanos según la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud. Según el artículo 11 se pueden identificar en la categoría de RIESGO MÍNIMO. Se adjunta copia del consentimiento informado.

PALABRAS CLAVE

Linfocito T, Interleuquina 17, Th17, esclerosis sistémica, Raynaud

ABSTRACT

Systemic sclerosis or scleroderma, is characterized by microvascular dysfunction, autoimmunity and fibrosis. There is uncontrolled production and deposition of collagen and other proteins in the extracellular matrix by fibroblasts in the skin, lungs, heart, gastrointestinal tract and other organs. The progressive accumulation of collagen ends up affecting the architecture and function of the tissue. Although the role of immune dysfunction in the pathogenesis of systemic sclerosis is accepted, the exact pathways that cause it have not been discovered. In recent years several investigators have documented a larger number of cells with IL-17 + immunoexpression in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and the skin of patients with scleroderma. This suggests that IL-17 is involved in physiopathology and may represent a promising therapeutic target. Today, there are targeted therapies for IL-17. Knowing the findings of this expression profile in our population can guide the realization of new investigations in this field.

KEYWORDS

Lymphocyte T, Interleukin 17, Th17, systemic sclerosis, Raynaud.

CONTENIDO

RESUMEN.....	3
Objetivo:.....	3
Metodología:	3
Resultados esperados:	3
Aspectos éticos:	3
PALABRAS CLAVE	3
ABSTRACT.....	4
KEYWORDS.....	4
MARCO TEÓRICO	6
Fibrosis:.....	6
Alteración vascular:.....	6
Autoinmunidad:	7
Linfocito T en la esclerosis sistémica:	7
Interleuquina 17 no es lo mismo que Th17	8
Interleuquina 17 en esclerosis sistémica	8
Terapias disponibles sobre IL-17A:.....	9
Criterios y resultados en esclerosis sistémica	9
OBJETIVO GENERAL.....	11
JUSTIFICACIÓN y planteamiento de problema	12
APROXIMACIÓN METODOLÓGICA	13
RESULTADOS ESPERADOS	16
ASPECTOS ÉTICOS.....	17
CRONOGRAMA:	18
PRESUPUESTO.....	19
REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS:.....	20

MARCO TEÓRICO

La esclerosis sistémica (SSc) es una enfermedad autoinmune compleja, heterogénea e incurable. Se caracteriza principalmente por fibrosis de órganos, cambios vasculares y autoinmunidad (Diagrama 1). Su presentación clínica es heterogénea pero suele manifestarse con esclerodermia, fenómeno de Raynaud, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, compromiso cardiaco, compromiso osteomuscular y gastrointestinal (1). Por consenso de expertos y de acuerdo con las características clínicas (localización del engrosamiento de la piel) y su historia natural, la SSc se ha dividido en afectación cutánea limitada (limited cutaneous Systemic Sclerosis – lcSSc) y afectación cutánea difusa (diffuse cutaneous Systemic Sclerosis - dcSSc) (2, 3). El compromiso pulmonar es actualmente la principal causa de mortalidad en estos pacientes, secundario a falla respiratoria relacionada con neumonía intersticial (35%) e hipertensión pulmonar (26%) (4).

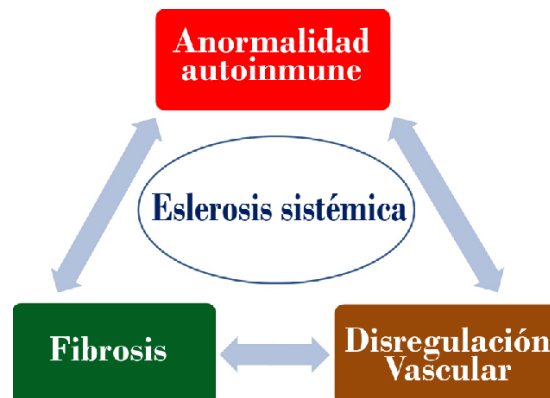


Diagrama 1. Resumen de los eventos fisiopatológicos que presentan los pacientes con esclerosis sistémica: autoinmunidad, alteraciones vasculares y fibrosis (modificado de (5)).

Fibrosis:

La fibrosis es el hallazgo patológico y clínico cardinal, dada por la producción y depósito descontrolado de colágeno (principalmente colágeno tipo I y III) y otras proteínas en la matriz extracelular por parte de los fibroblastos tisulares, y reducción en su degradación, que luego de un tiempo termina en disfunción de los fibroblastos, células musculares lisas y células del estroma. El tejido conectivo normal es reemplazado gradualmente por abundante matriz extracelular, lo que lleva a la disfunción de los órganos afectados y causando cambios patológicos. Los fibroblastos y las células musculares lisas vasculares se pueden convertir en miofibroblastos que no solo pueden producir colágeno, sino factor de crecimiento transformante b (TGF-b), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), interleuquina 6 (IL-6), Endotelina 1 (ET-1), y otros quimio tácticos, que pueden promover la proliferación celular y reducir la apoptosis (6, 7). En particular, se encuentran fibroblastos con aumento en expresión de mRNA procolágeno I y III en las zonas adyacentes a las células infiltrantes mononucleares, lo que sugiere que las células inflamatorias, en particular las células T, son responsables de la alteración funcional de los fibroblastos (8).

Alteración vascular:

En la patogénesis del daño vascular, la inflamación crónica juega un papel en el envejecimiento y daño de la célula endotelial, pero se sabe poco acerca de los eventos o mecanismos que inician la lesión vascular, impiden su reparación y conducen a la pérdida de la angiogénesis. La disregulación vascular se produce en la etapa más temprana de la

enfermedad y existe a lo largo de la enfermedad. En las primeras etapas de la esclerodermia, las células endoteliales se activan y las moléculas de adhesión expresadas sobre la célula endotelial promueven la infiltración perivascular de células inflamatorias, que en última instancia conduce a la disfunción endotelial y la apoptosis. Las primeras etapas de la esclerosis sistémica se caracterizan por una respuesta angiogénica exagerada, seguido más tarde por fibrosis. Las células endoteliales activadas liberan ET-1, un potente vasoconstrictor que promueve la adhesión de leucocitos, la proliferación de células del músculo liso vascular y activación de fibroblastos (9, 10). La reactividad vascular anormal asociada con fibrosis estructural de los vasos sanguíneos, resulta en hipoxia, reducción del flujo capilar, hiperplasia de la íntima y fibrosis de la membrana externa. Estas se corresponden con las manifestaciones clínicas, tales como el fenómeno de Raynaud, las úlceras digitales, la hipertensión pulmonar y la crisis renal hipertensiva (11, 12)

Autoinmunidad:

Casi todas las personas con esclerosis sistémica tienen anticuerpos circulantes detectables contra proteínas nucleares, sin embargo, en la mayoría de los casos los anticuerpos reconocidos no son directamente los causantes de la enfermedad (1). Hoy en día es más aceptado que la patogénesis de la esclerosis sistémica puede ser descrita por la teoría de una anomalía autoinmune, que puede vincular la vasculopatía y la fibrosis. Se observan anomalías de la inmunidad innata y adaptativa en los pacientes con esclerosis sistémica, y las células inmunes pueden desencadenar los cambios moleculares y bioquímicos complejos que se producen en la vasculopatía y la fibrosis; sin embargo, los detalles de los mecanismos subyacentes aún no se han descubierto. Múltiples estudios han proporcionado evidencia directa de que la inmunidad está implicada en la patogénesis de la esclerosis sistémica. Las alteraciones de la inmunidad celular se han tipificado por la presencia de células T aberrantes en los tejidos, así como en la sangre periférica de los pacientes con esclerosis sistémica (5, 13).

Linfocito T en la esclerosis sistémica:

La infiltración de células T CD4 + es significativamente mayor en la piel y en la sangre periférica de pacientes con esclerosis sistémica. La infiltración de células T es más evidente en la fase de edema que en la etapa de endurecimiento. Las células T activadas pueden estimular a los fibroblastos adyacentes a través de contacto directo célula-célula o a través de citoquinas y quimioquinas. Además, las células T autorreactivas pueden interactuar con las células B para promover la producción de autoanticuerpos característicos. Los anticuerpos antinucleares están presentes en aproximadamente el 95% de los pacientes con esclerosis sistémica y por lo general muestran patrón moteado o nucleolar (anti-topoisomerasa-I, anticuerpos anti-centrómero y anti-RNA polimerasa III). La identificación de los diferentes tipos de anticuerpos es importante para el diagnóstico, la clasificación y el pronóstico de esclerosis sistémica, pero no hay evidencia definitiva de que tales anticuerpos puedan promover la fibrosis o el daño en los tejidos. Por lo mencionado, las anomalías en las células T pueden contribuir a la iniciación y o promoción de proceso patológico, que conduce a la vasculopatía o fibrosis en pacientes con esclerosis sistémica (5). En la tabla 1 se resumen los diferentes subgrupos de células T CD4+ y la expresión de sus citoquinas más importantes en la patogénesis de la esclerosis sistémica.

Célula CD4+	Citoquina icónica	Expresión
Th1	IFN-g	Disminuida
Th2	IL-4, IL-5, IL-13	Incrementada

Th17	IL-17A, IL-17F	Incrementada
Treg	TGF- β , IL-10	Disminuida
Th9	IL-9 Increased	Incrementada
Th22	IL-22	Incrementada
Tfh	IL-21	No claro

Tabla 1. Células T CD4+ y su icónica expresión en esclerosis sistémica (5)

Interleuquina 17 no es lo mismo que Th17

La interleuquina 17 (conocida también como IL-17 o IL-17A o CTLA-8) fue aislada, clonada y secuenciada a partir de los hibridomas murinos [cytotoxic T lymphocyte antigen 8 (CTLA-8)] entre 1993 y 1996 (14-16), pero empezó a ser el centro de atención con el reconocimiento desde 2003 de una tercera población de células T CD4+, conocida como Th17, distinta de las clásicas Th1 y Th2, que produce IL-17A como citoquina insignia y que responde potentemente a IL-23 (17-19). Se aclara entonces que la IL-17 no solo es producida por Th17 sino también por células T $\gamma\delta$, citotóxicas, NK, neutrófilos, mastocitos y monocitos (15). Las células Th17 no solo producen IL-17A sino IL17F, IL-21 e IL-22 (17, 19). La interleucina-17 tiene un papel importante en la protección del huésped frente a patógenos extracelulares (hongos). La IL-17A y su receptor (IL-17RA) son los miembros fundadores de una nueva subfamilia de citoquinas/receptores, pro inflamación, con características estructurales únicas que los distinguen de otras subclases de citoquinas.

Interleuquina 17 en esclerosis sistémica

A continuación se hace un resumen de las descripciones hechas respecto a IL-17A/IL17RA en la autoinmunidad y en específico en esclerosis sistémica:

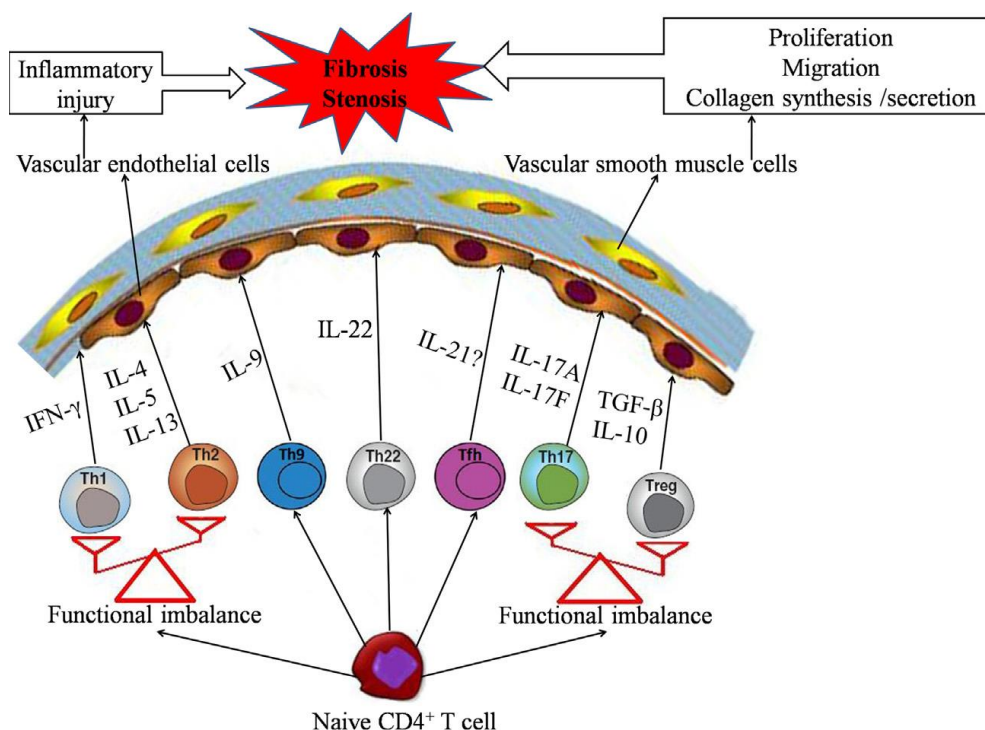


Diagrama 2. Interacción de las células T CD4+ con las células endoteliales y las células musculares lisas vasculares en esclerosis sistémica. Representación esquemática de la influencia de las células T CD4+ diferenciadas y sus citoquinas insignia sobre las células endoteliales y musculo liso y sus propiedades pro-inflamatorias y pro-fibrosis.

- Las células Th17 modulan la inflamación y la autoinmunidad (13, 20, 21).
- Los estrógenos regulan las células Th17 y participan en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes (20).
- Ha surgido un posible vínculo entre la Sjogren, AR, LES, la esclerosis sistémica y las células Th17 (20, 22, 23).
- Las células madre mesenquimales regulan las células Th17 de una manera dosis y tiempo dependiente en la enfermedad inflamatoria/autoinmune (20).
- En particular, las células Th17 han sido implicadas en la patogénesis de la esclerosis sistémica (24-27).
- Se ha encontrado un incremento en células Th17 produciendo IL-17 en sangre periférica, piel y tejido pulmonar en pacientes con esclerosis sistémica (5, 28-30).
- Los niveles de IL-17A se encuentran elevados tanto en la etapa temprana como activa de la esclerosis sistémica (5, 24, 26, 31, 32).
- Se ha encontrado que las células T CD4+ activadas que muestran alta expresión de IL-23R se incrementan en pacientes con esclerosis sistémica, y se relaciona con IL-17 (5, 20, 33).
- También se ha informado que los niveles de IL-6, IL-23 e IL-1 alfa están elevados en pacientes con esclerosis sistémica, lo que puede inducir la producción de IL-17 (5).
- La IL-21 se secreta principalmente por las células T CD4+ activadas y por células NK, lo que pueden potenciar la respuesta inflamatorias mediada por células Th17, mediante la inducción de la expresión del receptor IL-23 y la inhibición de las células Treg (5).
- La IL-21 también puede regular las respuestas de células Th1/Th2 y la producción de inmunoglobulinas (5).
- Los estudios también han demostrado que las moléculas de adhesión, tales como L-selectina e ICAM-1, pueden regular la infiltración de Th2 y Th17 en la piel y los pulmones, lo que conduce a la fibrosis (5).
- Datos de modelos de fibrosis en murinos indican que las células Th17 tiene un rol importante en el proceso patogénico de inflamación y fibrosis en piel y pulmón. La IL-17A aumentó la proliferación de los fibroblastos y colágeno tipo I en cultivos. Sugieren los autores que las células Th17 pueden ser dianas terapéuticas en esclerosis sistémica y puede proporcionar nuevos conocimientos sobre la patogenia de la esclerosis sistémica (34, 35).

Terapias disponibles sobre IL-17A:

Respecto a la disponibilidad de terapias dirigidas a Th17 o el eje IL-23 IL-17, existen terapias dirigidas como ustekinumab, briakinumab, guselkumab, tildrakizumab, secukinumab, brodalumab, ixekizumab (21, 36, 37), sin embargo a la fecha no existen estudios de ningún tipo que hayan valorado el uso de estas terapias en pacientes con esclerosis sistémica.

Criterios y resultados en esclerosis sistémica

El grupo de trabajo Outcome Measures in Rheumatology (OMERACT) fue creado con el objetivo de identificar, estandarizar y validar herramientas de medida, así como definiciones clínicas importantes para ser incluidas en ensayos clínicos sobre enfermedades reumatológicas. Su método de trabajo consiste en aplicar el denominado "filtro OMERACT", basado en los conceptos de: verdad, discriminación y viabilidad (38, 39). Los criterios de clasificación y sub clasificación se utilizan para distinguir entre pacientes con o sin un tipo

específico de enfermedad (diferenciar subgrupos de pacientes dentro de un grupo de la enfermedad lcSSc dcSSc). Los criterios del estado de la enfermedad pueden separarse en criterios de daño y criterios de actividad. El daño refleja lesiones irreversibles inducidas por la propia enfermedad o por tratamiento. La actividad implica la reversibilidad potencial de las lesiones. Los criterios pronósticos, incluidos los criterios de gravedad, están destinados a separar a los sujetos con un posible resultado bueno o favorable de aquellos con resultados pobres. Por último, los criterios de resultado pretenden medir el impacto global de una enfermedad. (40)

Actualmente los resultados validados en SSc son mRSS (modified Rodnan skin score), puntuación de la condición de Raynaud, capacidad vital forzada, cateterismo derecho, creatinina sérica, CPK y presión arterial (41).

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de IL17 en sangre periférica, en un grupo de pacientes adultos con esclerosis sistémica.

OBJETIVO ESPECIFICO

Determinar si los niveles de IL17 en sangre periférica de pacientes con esclerosis sistémica se correlacionan con los siguientes resultados clínicos: mRSS (modified Rodnan skin score), puntuación de la condición de Raynaud, capacidad vital forzada, creatinina sérica, presión arterial, tipo de esclerodermia, tiempo de evolución, alteración de órganos internos y patrón de capilaroscopia. Estos resultados clínicos son los validados en esclerosis sistémica por OMERACT.

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La autoinmunidad, la alteración vascular y la fibrosis son las características demostradas más relevantes en la esclerosis sistémica. El objetivo terapéutico está precisamente dirigido a ellas, sin que al momento se cuente con una terapia efectiva. Se encuentra producción y depósito descontrolado de proteínas en la matriz extracelular por parte de los fibroblastos que se encuentran en la piel, los pulmones, el corazón, el tracto gastrointestinal y muchos otros órganos. La acumulación progresiva del colágeno termina afectando la arquitectura y función del tejido. Aunque se acepta el papel de la disfunción inmune en la patogénesis de la esclerosis sistémica, las vías exactas que la causan no se han descubierto.

Las vías exactas de cómo se producen estas alteraciones fisiopatológicas, son desconocidas. La identificación en los últimos años de un mayor número de células con inmunoexpresión de IL-17R en sangre periférica, en lavado broncoalveolar y en la piel de pacientes con esclerodermia, entre otros hallazgos, sugiere que esta citoquina está involucrada en la vía de alteración de la fibrosis en piel y pulmón (y posiblemente otros órganos), y puede representar no solo un elemento pronóstico sino una diana terapéutica inmune promisorio. Existen 2 estudios destacados que han determinado los niveles de IL-17 en pacientes con esclerosis sistémica ambos hechos en Japón (Murata 2008 n=59 (32) y Kurasawa 2000 n=24 (28)). No existen estudios locales ni regionales explorando IL-17 en pacientes con esclerosis sistémica. Conocer los hallazgos del perfil de expresión en nuestra población permitirá generar una línea de base con datos locales para esta patología, los cuales permitirán la realización de nuevas investigaciones no solo descriptivas sino de intervención en este campo para así apoyar las actividades de esta línea de investigación o de investigación de Reumatología de la Universidad Nacional que está adscrita al programa de Medicina Interna de la Facultad de Medicina

APROXIMACIÓN METODOLÓGICA

Tipo de estudio: Es un estudio observacional, descriptivo de corte transversal.

Población objeto: La población objeto de estudio son pacientes con diagnóstico de esclerosis sistémica que asisten a consulta externa de reumatología del Hospital Simón Bolívar, atendidos por el grupo de reumatólogos de la Universidad Nacional dentro del convenio docente asistencial vigente.

Pregunta de investigación

¿En los pacientes con esclerosis sistémica se encuentra elevación de los niveles de interleuquina 17 y si estos se correlacionan con desenlaces clínicos validados en OMERACT?

Criterios de selección

- Criterios de inclusión: Pacientes que cumplan criterios de clasificación para esclerosis sistémica ACR/EULAR 2013 o que tengan diagnóstico clínico de esclerosis sistémica con edad igual o mayor a 15 años.
- Criterios de Exclusión: Pacientes con otras enfermedades autoinmunes o síndromes superpuestos, pacientes menores de 15 años, pacientes que no acepten participar en el estudio.

Tamaño de muestra: Se incluirán todos los pacientes que asistan a consulta con este diagnóstico y que acepten participar en el estudio. El tipo de muestreo es por conveniencia

Definición de Variables:

Nombre de la variable	Definición	Tipo	Unidad de medida
Edad	Tiempo en años desde el nacimiento hasta toma de la muestra	Cuantitativa	Años cumplidos
Sexo	Sexo del paciente	Cualitativa	Femenino o masculino
Diagnóstico	Fenotipo de clasificación de la enfermedad	Cualitativa	Limitada, difusa, sin esclerodermia

mRSS	Engrosamiento piel medido por escala modificada de Rodnan	Cuantitativa	0 a 51 puntos posibles
Hipertensión pulmonar	Diagnostico adicional del paciente	Cualitativa	Presente o ausente
Fibrosis pulmonar	Diagnostico adicional del paciente	Cualitativa	Sin fibrosis, fibrosis menor a 20% o fibrosis mayor al 20%
Creatinina	Niveles séricos de creatinina	Cuantitativa	Valor en sangre periférica en mg/dl
Patron capilaroscopia	Hallazgo en capilaroscopia de pliegue ungueal.	Cualitativa	Normal, temprano, activo y tardio
Raynaud	Presencia de fenómeno de Raynaud	Cualitativa	Presente o ausente
TAS	Presión arterial sistólica	Cuantitativa	En mmHg
TAD	Presión arterial diastólica	Cuantitativa	En mmHg

Procedimientos y recolección de datos

Se recolectaran pacientes de manera consecutiva de una consulta de reumatología institucional, y que cumplan los criterios de clasificación para esclerosis sistémica ACR/EULAR 2013. Se registran de estos pacientes las siguientes variables: Edad, sexo, duración de la enfermedad, compromiso de órganos internos, ANAs, Anti SCL-70, patron capilaroscopia, Rodnan modificado, tipo de compromiso: sine esclerodermia- cutáneo difuso- cutáneo limitado, tratamientos, niveles de IL-17. A todos los pacientes se les realizará historia clínica detallada, examen físico y registros de TCAR tórax, ecocardiograma, DLCO2. Dentro de la valoración habitual de los pacientes en el sistema de salud se realizan la mayoría de estos estudios, luego no se incluye su costo de los mismos. Los niveles de IL-17 no están disponibles en el laboratorio y el sistema de salud por lo cual este kit deberá ser adquirido para el desarrollo del proyecto.. El kit que se empleará para el procesamiento de muestras es de Thermo Scientific™ Pierce™ Human IL-17A ELISA, (Sensibilidad: 5 pg / mL, Rango de curva estándar: 31.25 pg / mL - 2000 pg / mL, tipos de muestras: suero, plasma, sobrenadante de cultivo celular, especificidad: este ELISA es específico para la medición de la IL17A humana natural y recombinante, volumen de la muestra: 50 µL, tiempo de incubación del ensayo total: 3,5 horas) el cual fue seleccionado por Angela Patricia Rojas, M.Sc, Dr Sc, quien hace parte del grupo de investigación. Teniendo en cuenta los hallazgo de laboratorio que se obtengan de un primer procesamiento, es posible que sea necesario confirmar por partida doble las muestras, esto también dependerá del volumen total de suero con el que se cuente,

La toma de las muestras será realizada por una bacterióloga entrenada y con experiencia en la venopunción de estos pacientes, esto bajo el conocimiento que los pacientes con esclerosis sistémica el engrosamiento cutáneo representa una dificultad en la visualización y punción de las venas periféricas. A todos los pacientes se les debe hacer el consentimiento informado (detalle en aspectos éticos).

El procesamiento de la muestra y obtención de resultados será realizado por Angela Patricia Rojas, M.Sc, Dr Sc profesional capacitada y con amplia experiencia en el procesamiento de estas muestras y se realizará cumpliendo con todos los estándares y normatividad vigente para las fases pre analíticas y analíticas. Las muestras serán conservadas en biobanco ubicado en la Universidad Nacional de Colombia. Todas las muestra y la información que sea recolectada a partir del desarrollo de las actividades del proyecto quedarán bajo la custodia del investigador principal y el subinvestigador. Para la referencia de los niveles séricos de IL-17 esperados se utilizaran los resultados de la cohorte sana histórica proporcionada por el fabricante del Scientific™ Pierce™ Human IL-17A ELISA que informa que en población sana no se detectan niveles de IL-17A. El procesamiento de las muestras será realizado en laboratorio a cargo del grupo de investigación: BIOLOGÍA CELULAR Y AUTOINMUNIDAD. Código Colciencias: COL0157942 avalado por la Universidad Nacional de Colombia.

Plan de análisis

Para describir las características sociodemográficas y clínicas de la muestra de participantes se emplearán frecuencias absolutas y relativas cuando las variables sean cualitativas; en el caso de variables cuantitativas se emplearán medidas de tendencia central y dispersión: medias y desviaciones estándar o medianas y rangos intercuartílicos, dependiendo de la distribución de los datos.

RESULTADOS ESPERADOS

1. Disponer de información local y en población colombiana de los niveles de IL-17 en pacientes con esclerosis sistémica y si existe correlación con resultados clínicos validados en SSc.
2. Los resultados del estudio serán publicados como investigación original y producto en revista de la especialidad.
3. Obtener los requisitos para trabajo de grado en la especialidad de reumatología.

ASPECTOS ÉTICOS

En esta investigación prevalecerá para los pacientes el criterio de respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y su bienestar.

Se da cumplimiento a la RESOLUCION N° 008430 DE 1993 (4 DE OCTUBRE DE 1993), por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. De acuerdo a artículo 11 esta investigación se considera:

“Investigación con riesgo mínimo: ...extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses”. Se aclara por petición de un revisor que esta es la cita textual de la resolución pero al paciente máximo se le extraen 20 ml.

La participación de los individuos del estudio será completamente voluntaria, se solicitará la firma del consentimiento informado donde se encuentra consignada entre otras, la siguiente información:

Acá podría adicionar el manejo confidencia de la información, custodia de la base de datos y de las muestras que se encuentren en el biobanco.

CRONOGRAMA:

Fecha de inicio del Proyecto: 01 de Enero de 2017.

Fecha de terminación: 06 Julio de 2017.

Duración: 6 meses.

ACTIVIDAD	Mes inicio	Duración (meses)
Recolección de pacientes y sus variables, firma de consentimiento informado. Toma de muestra sangre periférica.	1	5
Revisión de la base de datos y organización de la misma	5	5
Análisis Estadístico	6	1
Análisis de resultados	6	1
Redacción y propuesta de artículo de divulgación.	6	1

PRESUPUESTO

Rubro	Descripción del Rubro	Costos	Nuevo y ajustado (27-Ener-2017)
Materiales y suministros	kits x380 pruebas para IL-17A, Insumos para toma de muestras tubos para química sanguínea, sistemas de recolección, crioviales de 1.5ml, puntas desechables para micropipeta de todos los volúmenes, bastidores para almacenamiento de muestras en el biobanco, Base datos formato web con seguridad óptima, mantenimiento del biobanco	\$ 15.000.000	\$ 15.000.000
Impresos y Publicaciones	Para traducción de artículo científico, producto del estudio, a someter a publicación en revista internacional	\$ 1.000.000	\$ 0
Compra de equipo	Lavador de placas de ELISA	\$ 1.200.000	\$ 1.200.000
Remuneración por Servicios Técnicos	Bacterióloga para toma de muestras y procesamiento de los kits (pruebas), auxiliar para ingreso de información a la base de datos, estadístico para análisis de datos. Persona con experiencia en la Traducción de artículo científico	\$ 7.800.000	\$ 8.800.000
Total		\$ 25.000.000	\$ 25.000.000

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Stern EP, Denton CP. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2015;41(3):367-82.
2. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *The Journal of rheumatology*. 1988;15(2):202-5.
3. Medsger TA, Jr. Natural history of systemic sclerosis and the assessment of disease activity, severity, functional status, and psychologic well-being. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2003;29(2):255-73, vi.
4. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airo 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. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(10):1809-15.
5. Liu M, Wu W, Sun X, Yang J, Xu J, Fu W, et al. New insights into CD4(+) T cell abnormalities in systemic sclerosis. *Cytokine & growth factor reviews*. 2016;28:31-6.
6. Varga JA, Trojanowska M. Fibrosis in systemic sclerosis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2008;34(1):115-43; vii.
7. Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpfissinger T-F, Feichtinger J, Zelger B, et al. The Immunology of Fibrosis. *Annual Review of Immunology*. 2013;31(1):107-35.
8. Scharffetter K, Lankat-Buttgereit B, Krieg T. Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in-situ hybridization. *European Journal of Clinical Investigation*. 1988;18(1):9-17.
9. Guiducci S, Distler O, Distler JHW, Matucci-Cerinic M. Mechanisms of vascular damage in SSc—implications for vascular treatment strategies. *Rheumatology*. 2008;47(suppl 5):v18-v20.
10. Motegi S-i, Okada E, Uchiyama A, Yamada K, Ogino S, Yokoyama Y, et al. Role of endothelin-1/endothelin receptor signaling in fibrosis and calcification in nephrogenic systemic fibrosis. *Experimental Dermatology*. 2014;23(9):664-9.
11. Kavian N, Batteux F. Macro- and microvascular disease in systemic sclerosis. *Vascular Pharmacology*. 2015;71:16-23.
12. Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: Evidence That Systemic Sclerosis Is a Vascular Disease. *Arthritis & Rheumatism*. 2013;65(8):1953-62.
13. Brembilla NC, Chizzolini C. T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. *European cytokine network*. 2012;23(4):128-39.
14. Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Current opinion in immunology*. 2011;23(5):613-9.
15. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(8):556.
16. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003;14(2):155-74.
17. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*. 2009;27(1):485-517.
18. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-69.
19. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*. 2010;28(1):445-89.
20. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DTW, et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2014;13:1174-81.
21. Van Den Berg WB, McInnes IB. Th17 cells and IL-17 A-Focus on immunopathogenesis and immunotherapeutics. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2013;43:158-70.

22. Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends in Immunology*. 2011;32:603-11.
23. Yang J, Sundrud MS, Skepner J, Yamagata T. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2014;35:493-500.
24. Balanescu P, Ladaru A, Balanescu E, Nicolau A, Baicus C, Dan GA. IL-17, IL-6 and IFN-gamma in Systemic Sclerosis Patients. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne*. 2015;53(1):44-9.
25. Liu X, Gao N, Li M, Xu D, Hou Y, Wang Q, et al. Elevated levels of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cells in systemic sclerosis patients contribute to the secretion of IL-17 and immunosuppression dysfunction. *PloS one*. 2013;8(6):e64531.
26. Liu X, Gao N, Li M, Xu D, Hou Y, Wang Q, et al. Increase of CD4+CD25+FOXP3 + T cell in patients with systemic sclerosis could secret IL-17 with dysfunction of immunosuppression. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64:S983.
27. Lonitescu RC, Sfrent-Cornateanu R, Mihai C, Bojinca M, Macovei L, Ciofu C, et al. Raised interleukin-4 and interleukin-17 serum levels in patients with systemic sclerosis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2010;28(2):S133-S4.
28. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43:2455-63.
29. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):R166.
30. Velosa APP, Paiva MA, Andrade PC, Christmann RB, Eher EM, Fernezlian SM, et al. IL-17+ cells immunoexpression in systemic sclerosis pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*. 2014;44.
31. Demir C, Ali S, Orhan K, Murat T, Nuran T, Sükran E, et al. Comparison of serum IL-23 and IL-17 levels in patients with systemic sclerosis and healthy subjects. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*. 2015;6(1):83-7.
32. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: Is systemic sclerosis a Th17 disease? *Journal of Dermatological Science*. 2008;50:240-2.
33. Olewicz-Gawlik A, Danczak-Pazdrowska A, Kuznar-Kaminska B, Gornowicz-Porowska J, Katulska K, Trzybulska D, et al. Interleukin-17 and interleukin-23: Importance in the pathogenesis of lung impairment in patients with systemic sclerosis. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2014:664-70.
34. Lei L, He Z-Y, Zhao C, Sun X-J, Zhong X-N. Elevated frequencies of CD4+IL-21+T, CD4+IL-21R+T and IL-21+Th17 cells, and increased levels of IL-21 in bleomycin-induced mice may be associated with dermal and pulmonary inflammation and fibrosis. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2016;19(4):392-404.
35. Lei L, Zhao C, Qin F, He ZY, Wang X, Zhong XN. Th17 cells and IL-17 promote the skin and lung inflammation and fibrosis process in a bleomycin-induced murine model of systemic sclerosis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2016.
36. Fragoulis GE, Siebert S, McInnes IB. Therapeutic Targeting of IL-17 and IL-23 Cytokines in Immune-Mediated Diseases. *Annual Review of Medicine*. 2016;67(1):337-53.
37. Yan JW, Wang YJ, Peng WJ, Tao JH, Wan YN, Li BZ, et al. Therapeutic potential of interleukin-17 in inflammation and autoimmune diseases. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2014;18(1):29-41.
38. Boers M, Kirwan JR, Tugwell P, Beaton D, Bingham-III CO, Conaghan P, et al. The OMERACT Handbook: OMERACT; 2014 [cited 2015 03/11]. Available from: http://www.omeract.org/pdf/OMERACT_Handbook.pdf.

39. Richards P, De Wit M. OMERACT Glossary for patient research partners: OMERACT; 2012 [cited 2015 03/11]. Available from: <http://www.omeract.org/pdf/OMERACT11%20Glossary.pdf>.
40. Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S, Bencivelli W, Silman AJ, D'Angelo S, et al. European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. II. Identification of disease activity variables and development of preliminary activity indexes. *Annals of the rheumatic diseases*. 2001;60(6):592-8.
41. Furst DE. Outcome measures in rheumatologic clinical trials and systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2008;47(suppl 5):v29-v30.