

Valenzuela Antonia<sup>1,2</sup>; Pérez Guillermo<sup>1</sup>; Chung Lorinda<sup>3</sup>; Sánchez Felipe<sup>1</sup>; Montalva Rebeca<sup>1</sup>; Borzutzky Arturo<sup>1</sup>.

1. Pontificia Universidad Católica de Chile, 2. Red de Salud UC Christus, 3. Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California.

## Introducción.

La calcinosis cutis, depósito de calcio insoluble en la piel y tejido subcutáneo es una manifestación común en los pacientes con esclerosis sistémica (ES) y su presencia se asocia con discapacidad funcional de las manos. Aunque su patogénesis no está completamente elucidada, cada vez hay más evidencia de una relación entre la hipoxia vascular, la desregulación de las proteínas de la matriz ósea y el desarrollo de calcinosis en ES.

## Objetivo (s).

Evaluar si la presencia de calcinosis confirmada radiográficamente en las manos de pacientes con ES se asocia con un aumento de la osteoclastogénesis y niveles elevados del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) - un potente factor angiogénico que se ha validado como biomarcador de isquemia en plasma

## Metodología

Se reclutaron 20 pacientes con ES (10 con calcinosis y 10 sin calcinosis) y 10 controles sanos pareados por edad y sexo. La calcinosis se confirmó con RX de manos las que se evaluaron utilizando la escala de severidad radiográfica para calcinosis validada por el Scleroderma Clinical Trials Consortium (SCTC). Se midieron marcadores de resorción ósea RANKL (Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B) y OPG (osteoprogerina) y de función endotelial VEGF y Angiotensina 1 (Ang-1) y 2 (Ang-2) en plasma por método ELISA de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los ensayos ELISA utilizados en este estudio fueron todos de clasificación RUO (Research use only) y aquellos analitos (Rankl y OPG) en los que se obtuvieron resultados significativos representan una posibilidad para el seguimiento de los pacientes por lo que su validación para uso clínico podría ser de utilidad. La etapa preanalítica fue de vital importancia para la obtención de resultados confiables en este estudio, debido a que la obtención del plasma a partir de muestras con EDTA debe realizarse antes de 30 minutos de obtenida la muestra (1000 g por 15 min a 2-8°C) y que Angio-1 requiere además una segunda centrifugación por 10 minutos a 10.000g para depletar el plasma de plaquetas que contienen en sus gránulos Angio-1 cuya liberación elevaría los niveles de Angio-1

La osteoclastogénesis se evaluó cultivando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en presencia de RANKL y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), los osteoclastos se identificaron con tinción de fosfatases acidas tartrato resistentes Sigma Aldrich.

## Resultados.

Después de 9 días en cultivo, las PBMCs de pacientes con calcinosis generaron un número significativamente mayor de osteoclastos ( $33.0 \pm 20.3$  células/pozo) en comparación con los pacientes sin calcinosis ( $15.3 \pm 6.9$ ) y los controles sanos ( $11.2 \pm 2.6$ ) ( $p=0.001$ ). La severidad de la calcinosis no se correlacionó con el número de osteoclastos, pero sí con niveles de RANKL ( $r = 0.82$ ), Ang-2 ( $r = 0.86$ ) y con la relación RANKL/OPG ( $r = 0.86$ ). Los niveles plasmáticos de VEGF fueron numéricamente más bajos en pacientes con ES y calcinosis que en pacientes con ES sin calcinosis y en controles sanos; sin embargo, esta diferencia no alcanzó significación estadística.

## Conclusiones.

La calcinosis en pacientes con ES se asocia con una mayor propensión de las células sanguíneas periféricas a formar osteoclastos. Asimismo, la correlación entre la severidad de la calcinosis y tanto los niveles de sRANKL como la relación sRANKL/OPG, sugiere una mayor actividad osteoclástica y un aumento de la resorción ósea asociado a la calcinosis. La inhibición dirigida de la osteoclastogénesis puede proporcionar una opción terapéutica específica en pacientes con calcinosis asociada a ES.