

TESIS DOCTORAL

“ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONJUNTIVO:

APORTACIONES A LA CLÍNICA, INMUNOLOGÍA Y GENÉTICA”

Tesis para optar al grado de Doctor, realizada por Doña Mónica Ruiz Pombo en el Departamento de Medicina Interna del Hospital General Vall d'Hebron, bajo la dirección del Prof. Miquel Vilardell Tarrés, Jefe de Servicio y Catedrático de Medicina y del Dr. Albert Selva O'Callaghan, Profesor Asociado de Medicina.

Barcelona, Septiembre 2007.

A mis padres Julián y Teresa, a los que les debo todo lo que soy como persona. A ellos que siempre han permanecido a mi lado dándome aquel ánimo que en muchas ocasiones ha sido tan necesario. A ellos que me han inculcado el respeto y el valor humano, tan importante en nuestra profesión. A ellos que siempre han sabido guiarme por el mejor camino. A ellos a los que adoro.

A mi hermana Teresa, que me ha orientado, guiado y aconsejado cuando lo he necesitado. A ella, que ha sido partícipe de toda la evolución de mi carrera, compartiendo momentos de estudio y de descanso, de nerviosismo y de alegría. A mi hermana, presente en los momentos más importantes de mi vida y a la que debo gran parte de lo que soy.

A mi marido Àngel, que de forma incondicional ha estado apoyando todas las decisiones importantes a las que me he tenido que enfrentar. A él, que con su espíritu optimista me ha dado ánimos en los momentos de desánimo. A él, que está a mi lado en todo momento y que tanto quiero. No cambies nunca Àngel.

“En el verano de 1976 una paciente de 65 años de edad ingresó en el Servicio que hoy dirige el Prof. Miquel Vilardell y fue diagnosticada por el Dr. Josep Àngel Bosch Gil a la sazón médico adjunto y por su residente el Dr. Vicente Fonollosa de estar afectada por una enfermedad sistémica con rasgos de lupus, esclerodermia y miositis. Por aquel entonces Sharp definió lo que sería la enfermedad mixta del tejido conjuntivo, cuyo principal rasgo inmunológico era la presencia de anticuerpos antinucleares a título elevado sensibles a la enzima ribonucleasa. El estudio inmunológico de la referida paciente llevado a cabo en el Departamento de Inmunología, del Middlesex Hospital, en Londres confirmó que se trataba de una enfermedad mixta del tejido conjuntivo o síndrome de Sharp, probablemente el primer caso descrito en nuestro país y que motivó la concesión del Premio Farreras Valentí a los citados médicos, Dr. Bosch y Dr. Fonollosa. La paciente falleció de una afección pulmonar intersticial. Sirva la presente Tesis Doctoral de homenaje a esta paciente y de reconocimiento a la sagacidad y perspicacia clínica de estos médicos, hoy de reconocido prestigio en el ámbito de las enfermedades autoinmunes sistémicas”.

AGRADECIMIENTOS

A todos los pacientes que me han permitido, con su colaboración llevar a cabo esta Tesis Doctoral, ya que sin ellos no hubiera sido posible realizarla.

A mis compañeros de Residencia, con los que de una forma u otra, he compartido mis inquietudes y horas de trabajo y con los que he disfrutado durante mi etapa de formación.

Al Dr. Albert Selva, que me ha contagiado su interés por los pacientes y por la medicina así como la calidad humana que de él se desprende. Destacaré su profesionalidad como médico y su infinita bondad como persona. Me enorgullece que me haya dirigido la tesis, que me haya hecho partícipe de sus conocimientos. A mi amigo que tanto aprecio y al que siempre estaré agradecida.

A todo el personal de enfermería y médicos del Servicio de Medicina Interna que dirige el Dr. Miquel Vilardell, por su amabilidad y colaboración.

A los Drs. Luis Martínez Lostao y Moisés Labrador Horrillo de la Unidad de Investigación en Enfermedades Sistémicas que tan acertadamente dirige el Dr. Josep Ordi Ros, por su ayuda en el estudio Inmunológico.

A Ruth Domínguez Pareto por su inestimable ayuda en el análisis estadístico, por su interés y perspicacia. Por haberme hecho ver aspectos interesantes de la estadística.

A José Miguel Martínez Martínez por su actitud colaboradora, ingeniosa e incansable delante de los retos surgidos en el estudio estadístico de la tesis.

Al Dr. Eduard Palou, médico del Centre de Transfusions i Banc de Teixits de Barcelona, por su paciencia y sabiduría en la interpretación de los resultados referentes al sistema de histocompatibilidad.

A la Dra. M^a José Rodrigo Anoro, del Servicio de Inmunología de nuestro centro, y a sus enfermeras Carmen y Margarita por su inestimable ayuda en la determinación de autoanticuerpos.

Finalmente y de forma muy especial quiero expresar mi agradecimiento a los Drs. Alberto Selva O'Callaghan y Miquel Vilardell Tarrés, directores de esta Tesis, a quienes tengo que agradecer gran parte de lo que profesionalmente soy así como su amistad prestada de forma desinteresada, cuya categoría humana y profesional algún día me gustaría alcanzar.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....pág...4

INTRODUCCIÓN.....pág..11

a.- HISTORIA DE LAS CONECTIVOPATÍAS.....pág..12

a.1.- Conectivopatía indiferenciada.....pág..15

a.2.- Síndromes de superposición.....pág..18

a.2.1.- Escleromiositis.....pág..19

a.2.2.- Lupus.....pág..21

a.2.3.-Síndrome de Reynolds.....Pág..22

a.3.- Enfermedad mixta del tejido conjuntivo.....pág..23

a.3.1.- Manifestaciones clínicas.....pág..26

a.3.2.- Alteraciones inmunológicas características.....pág..31

a.3.3.- Predisposición genética. Asociación con el
sistema mayor de histocompatibilidad (HLA).....pág..35

b.- OBJETIVOS.....pág..37

PACIENTES, MATERIAL Y METODOS.....	pág..38
a.- PACIENTES.....	pág..39
a.1.- Protocolo de recogida de datos.....	pág..40
a.2.- Estudios realizados.....	pág..42
a.3.- Definición grupo control.....	pág..43
b.- MATERIAL Y MÉTODO.....	pág..44
b.1.- Metodología para detección de anticuerpos.....	pág..44
b.1.1.- Inmunofluorescencia indirecta.....	pág..44
b.1.2.- Enzimoinmunoanálisis.....	pág..45
b.1.3.- Inmunoensayo en “tiras”.....	pág..47
b.1.4.- Immunoprecipitación.....	pág..49
b.2.- Metodología para detección de HLA.....	pág..57
b.2.1.- Técnicas Serológicas.....	pág..57
b.2.2.- Técnicas de Biología molecular.....	pág..60
b.3.- Estudio estadístico.....	pág..62
b.3.1.- Análisis descriptivo univariante.....	pág..63
b.3.2.- Análisis bivariante.....	pág..68
b.3.3.- Estudio de asociación entre alelos MICA y HLA...pág..70	
b.3.4.- Estudio de la concordancia entre criterios diagnósticos.....	pág..71
b.3.5.- Relación entre los síntomas y el cumplimiento de los criterios diagnósticos.....	pág..75
b.3.6.- Análisis multivariante y correspondencias múltiples.....	pág..77

RESULTADOS.....	pág..83
a.- ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA SERIE CLÍNICA.....	pág..84
b.- ESTUDIO INMUNOLÓGICO Y ANALÍTICO.....	pág..98
c.- ESTUDIO DEL SISTEMA DE HISTOCOMPATIBILIDAD.....	pág.101
d.- CONTRACCIÓN DEL EPÍTOPO.....	pág.106
e.- ANÁLISIS DE VARIABLES.....	pág.108
f.- CONCORDANCIA ENTRE LOS DIFERENTES CRITERIOS DIAGNÓSTICOS.....	pág.110
g.- ASOCIACIÓN ENTRE LA SINTOMATOLOGÍA Y EL CUMPLIMIENTO DE LOS CRITERIOS.....	pág.115
h.- PROPUESTA DE NUEVOS CRITERIOS.....	pág.119

DISCUSIÓN.....	pág.131
a.- EMTC COMO ENTIDAD INDEPENDIENTE Y SU RELACIÓN CON OTRAS CONECTIVOPATÍAS.....	pág.132
b.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y HALLAZGOS INMUNOLÓGICOS EN LA EMTC.....	pág.141
c.- CONTRACCIÓN DEL EPÍTOPO.....	pág.150
d.- VALORACIÓN DEL MICA Y SISTEMA HLA.....	pág.154
e.- CRITERIOS DIAGNÓSTICOS. CONCORDANCIA ENTRE LOS CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN.....	pág.157
f.- VALORACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LOS SÍNTOMAS Y CUMPLIMIENTO DE CRITERIOS.....	pág.161
g.- PROPUESTA DE NUEVOS CRITERIOS.....	pág.164

CONCLUSIONES.....pág.167

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....pág.169

INTRODUCCIÓN

a.- HISTORIA DE LAS CONECTIVOPATÍAS

En 1942, Paul Klemperer et al¹ agruparon bajo el término de conectivopatías o colagenosis un grupo de enfermedades de características clínicas similares, con alteraciones en el tejido conectivo o de sostén como sustrato patológico, con afectación multisistémica y probable etiopatogenia autoinmune.

La teoría de Morgagni, la cual se menciona en dicho trabajo, insiste en la afectación multiorgánica de dichas enfermedades, intentando hallar tanto por anatomía patológica como por clínica alteraciones comunes en los órganos afectados. El gran avance de la medicina en el siglo XIX, fue relacionar las observaciones clínicas en el hospital y los hallazgos *postmortem*, en la sala de autopsias.

La búsqueda de ésta relación clínico patológica, orientó hacia la unidad de ciertos órganos, formando parte de un sistema tisular común. Ya en 1942, se habla del tejido conectivo como un sistema individualizado porque consta de una asociación de células similares y elementos fibrilares cohesionados por un tercer componente, una sustancia amorfa o tejido de sostén. A estos elementos que conformaban el tejido conjuntivo se les atribuyó funciones diversas, además de la más básica que era servir de soporte.

La interposición entre las células parenquimatosas y la sangre circulante y los espacios linfáticos del cuerpo, le confería la cualidad de transferir metabolitos manteniéndose así el equilibrio corporal, como por ejemplo en la regulación del balance hidrosalino.

Entender las funciones del tejido conjuntivo implicaba el conocimiento de la naturaleza coloidal de la porción extracelular del mismo. Este conocimiento es asimismo imperativo para la apreciación de la respuesta del tejido conjuntivo en la inflamación y degeneración. La aparente afectación heterogénea de varios órganos en estas enfermedades no se llegó a entender hasta que se evidenció que la base patogénica en todos los órganos era la misma, expresándose en cada uno de ellos como manifestación local de un proceso mórbido que afectaba al tejido colágeno. La más importante de esas alteraciones fue la degeneración fibrilar. La estrechez y grosor de las fibras del colágeno, su aparente friabilidad, su intensa eosinofilia y refractividad junto al visible incremento de la sustancia coloide se orientó como debida a una profunda aberración fisicoquímica del estado coloide del tejido conjuntivo.

James F. Fries² en 1994, expuso unos criterios para el diagnóstico de enfermedad reumática, hecho que expresaba la dificultad en la detección de dichas enfermedades debido a la falta de manifestaciones específicas. Así, era preciso para su identificación la combinación de la clínica, y a veces, determinados hallazgos característicos obtenidos en el laboratorio. Estos criterios incluían: *criterios de clasificación*, donde separaba los pacientes con enfermedad de la población general, y éstos con enfermedad de los que presentaban una enfermedad confusa, tendiendo a la agrupación de las formas más puras; *criterio pronóstico*, donde separaba los pacientes con un potencial buen pronóstico de los de mal pronóstico y *criterios de actividad*, valorando la actividad de la enfermedad o bien las consecuencias de la misma.

La presencia de criterios diagnósticos, clínicos y biológicos propios de cada entidad permite individualizar estas enfermedades. Sin embargo, en determinados casos, el paciente no cumple los criterios establecidos, lo que hace imposible el diagnóstico de una enfermedad concreta y conduce a una cierta confusión.

La identificación y diagnóstico de las enfermedades autoinmunes sistémicas, requiere el reconocimiento de determinadas manifestaciones clínicas a las que se suelen asociar autoanticuerpos específicos y/o característicos. La observación de pacientes con rasgos clínicos de diferentes conectivopatías –lupus, esclerodermia y miositis- junto a un marcador inmunológico (anti-U1snRNP) permitió a Sharp et al³ en 1972 definir e individualizar una nueva entidad que se denominó enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC). Desde entonces, la polémica y la controversia han acompañado su existencia⁴⁻⁹.

Algunos autores no encuentran diferencias entre la EMTC y las conectivopatías indiferenciadas o los síndromes de superposición, mientras que otros consideran que la EMTC presenta unas características clínicas, inmunológicas y genéticas propias que permiten su individualización dentro del complejo grupo de las enfermedades sistémicas autoinmunes. Es de indudable interés poder diferenciar subgrupos de pacientes que nos permitan realizar una aproximación etiopatogénica, terapéutica y pronóstica más selectiva. A continuación se comentan las características propias de la conectivopatía indiferenciada, los síndromes de superposición y la EMTC haciendo énfasis en su diferenciación clínica e inmunológica.

a.1.- CONECTIVOPATÍA INDIFERENCIADA

Se denomina también enfermedad del tejido conjuntivo inclasificable o no diferenciada. Hace referencia a las enfermedades sistémicas autoinmunes que, aún sin cumplir criterios diagnósticos para ninguna de las conectivopatías clásicas, presentan rasgos clínicos e inmunológicos que las sugieren^{10,11}.

En un porcentaje no despreciable de casos, el paso del tiempo permite un diagnóstico cierto, tal y como demuestran amplios estudios de seguimiento longitudinal^{12,13}. Un buen ejemplo de ello, son los pacientes con anticuerpos anti-Ro, leucopenia, esplenomegalia y artritis¹⁴. Se puede considerar que están afectados por una conectivopatía indiferenciada (*Undifferentiated Connective Tissue Disease, UCTD*) que evolucionará hacia un lupus eritematoso cutáneo subagudo, un síndrome de Sjögren o bien persisten en esta situación de indiferencia diagnóstica que el clínico debe saber reconocer y valorar adecuadamente.

En un estudio de seguimiento a 10 años, realizado en 100 pacientes con anticuerpos anti-Ro, hasta un 25% presentó un comportamiento dinámico, con una evolución desde una conectivopatía indiferenciada hacia un síndrome de Sjögren o una artritis reumatoide¹⁴.

Al margen de si cumplen criterios diagnósticos de una determinada entidad o no, en algunos casos, como en los pacientes con anticuerpos anti-Ro, parece existir una clara correlación entre determinadas manifestaciones clínicas (lesiones cutáneas circinadas tras la exposición solar, síndrome seco, fibrosis pulmonar, vasculitis, bloqueo cardíaco, esplenomegalia y otras) y la presencia de estos anticuerpos, lo que les confiere un valor patogénico y refuerza la importancia de su detección aunque sea formando parte de una UCTD.

Un caso paradigmático de UCTD es el llamado *lupus incompleto*, que hace referencia a pacientes con sospecha clínica de lupus pero que no cumplen los 4 criterios necesarios para un correcto diagnóstico¹⁵. Más de la mitad de estos pacientes desarrollará un cuadro de lupus florido en el transcurso de los 5 años siguientes¹⁶.

La publicación de un estudio sobre 665 pacientes con UCTD¹⁷ controlados durante un período de 5 años revela que una tercera parte (34,5%) desarrollará una entidad concreta o definida, principalmente en los 2 primeros años de seguimiento, mientras que las dos terceras partes restantes (65,5%) permanecerán en un estado clínico de indeterminación diagnóstica. En 82 pacientes (12,3%) se observa una remisión completa de los síntomas, que llegan a desaparecer en su totalidad a los 5 años de seguimiento.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en este estudio incluyen la presencia de fenómeno de Raynaud, síndrome seco, poliartritis, exantema cutáneo, miositis, afectación pulmonar, fiebre, vasculitis y polineuropatía.

Y el diagnóstico al final del seguimiento pone de manifiesto que algunos pacientes habían evolucionado a conectivopatías bien diferenciadas, tales como artritis reumatoide (87 pacientes), síndrome de Sjögren (45 pacientes), esclerodermia (19 pacientes), lupus (28 pacientes), vasculitis (22 pacientes) o miopatías inflamatorias (3 pacientes).

Así, el diagnóstico de UCTD se basa en la presencia de características clínicas e indicadores inmunológicos que sugieren la presencia de una enfermedad autoinmune sin cumplir criterios suficientes para su diagnóstico.

Se ha intentado establecer sistemas de clasificación de estas enfermedades inclasificables. Para algunos autores¹⁸, el diagnóstico de UCTD debería sugerirse ante la presencia de al menos 3 de 11 indicadores clínicos o inmunológicos, mientras que para otros¹⁹, la presencia de un marcador inmunológico y una manifestación clínica característica sería suficiente para el diagnóstico.

a.2.- SÍNDROMES DE SUPERPOSICIÓN

La coexistencia de 2 ó más enfermedades autoinmunes constituye lo que denominamos síndromes de superposición^{10,11}. Es imprescindible que se cumplan indistintamente los criterios diagnósticos suficientes en cada una de las enfermedades que se superponen²⁰.

Así, por ejemplo, la presencia de miositis y esclerodermia, lupus y artritis reumatoide o esclerodermia y cirrosis biliar primaria son algunos de los síndromes de superposición más conocidos^{21,22}.

a.2.1.- Escleromiositis

La presencia de un indicador inmunológico propio contribuye a delimitar con mayor facilidad un grupo de pacientes con manifestaciones clínicas características.

El síndrome de superposición de esclerodermia y miositis, se asocia al marcador inmunológico constituido por una proteína de 75kD/100kD, antígeno frente al que se dirige el denominado anticuerpo anti-PM/Sci²³⁻²⁵ que forma parte del exosoma humano; estructura proteica compleja formada por 16 proteínas ubicada en el citoplasma celular y que participa de manera activa en el procesamiento del ARN durante la síntesis proteica.

Estos pacientes cumplen criterios diagnósticos de esclerodermia y de miositis inflamatoria, sea polimiositis, dermatomiositis o, de forma aún mas infrecuente, de miositis por cuerpos de inclusión²⁶.

Se da la circunstancia que algunas de las manifestaciones clínicas de este síndrome de superposición remedan las del llamado síndrome por anticuerpos antisintetasa, observado en pacientes con miopatía inflamatoria. Así, se puede detectar artritis o artropatía, fenómeno de Raynaud con alteraciones en el estudio capilaroscópico (megacapilares, áreas avasculares y otros), fiebre, alteraciones cutáneas en forma de dermatitis en la cara lateral de los dedos o “manos de mecánico” y como principal manifestación, o al menos la de mayor relevancia, fibrosis pulmonar.

Ocasionalmente se ha descrito enfermedad renal grave en forma de crisis renal esclerodérmica en pacientes portadores de este autoanticuerpo²⁷. Otros indicadores inmunológicos de este síndrome de superposición que pueden detectarse con menor frecuencia incluyen los anticuerpos anti-snRNP en sus diferentes subfracciones (U2 y U5)^{28,29} y los anticuerpos anti-Ku dirigidos contra el complejo proteico nuclear constituido por dos polipéptidos de 86kD/70 kD, relacionado con el procesamiento del ADN³⁰.

a.2.2.- Rupus

En este síndrome de superposición, el paciente cumple los criterios diagnósticos de artritis reumatoide y de lupus eritematoso sistémico. Son características la presencia de erosiones en las articulaciones del carpo y la positividad de los anticuerpos antinucleares junto a la presencia de anticuerpos anti-dsADN positivos.

Estudios realizados en determinados subgrupos étnicos permiten asignar a estos pacientes una cierta predisposición genética a presentar el síndrome, representada en los antígenos de histocompatibilidad HLA-DR1 y HLA-DR2³¹.

Se trata de una entidad infrecuente, con una prevalencia en estudios iniciales del 0,09%^{32,33} entre los pacientes con lupus y/o artritis reumatoide, pero con indudable protagonismo clínico, ya que condiciona una variación en el pronóstico y tratamiento de estos pacientes.

a.2.3.- Síndrome de Reynolds

La asociación de cirrosis biliar primaria (CBP) y esclerodermia recibe el nombre de síndrome de Reynolds³⁴. En pacientes con CBP es frecuente encontrar alteraciones capilaroscópicas similares a las halladas en la esclerodermia³⁵, incluso pueden coexistir los anticuerpos considerados específicos para cada una de las dos enfermedades, los antimitocondriales en su isotipo anti-M2 de la CBP y los anticentroméricos propios de la esclerodermia limitada.

Algunas manifestaciones sistémicas, como la alteración de la motilidad intestinal, la fibrosis pulmonar o la hipertensión pulmonar primaria, son comunes a ambas entidades, lo que puede dificultar su diferenciación clínica³⁶.

a.3.- ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONJUNTIVO

Descrita inicialmente por Sharp et al³ en 1972, al observar un grupo de pacientes con rasgos clínicos de lupus, esclerodermia y polimiositis que presentaban un indicador inmunológico característico: la presencia de valores muy elevados de anticuerpos antinucleares y sensibles a la acción de la enzima ribonucleasa, lo que sugería una especificidad antigénica frente a una ribonucleoproteína nuclear (RNP).

Posteriormente se pudo identificar el antígeno frente al que se dirigían estos autoanticuerpos, una fracción del *spliceosoma* citoplasmático que se identifica como U1-snRNP^{4,5,7}. Esta estructura, el *spliceosoma*, está constituida por una cadena de ARN rica en uridina asociada a 11 proteínas (70 kD, A, C, B, B', D1, D2, D3, E, F y G). Los anticuerpos anti-U1snRNP identifican la porción antigénica de 70 kD, A, C. Los anti-Sm, considerados muy específicos aunque poco sensibles en el diagnóstico de pacientes con lupus eritematoso sistémico, se dirigen preferentemente contra las porciones B, B', D1, D2, D3 del *spliceosoma*^{37,38} (fig. 1).

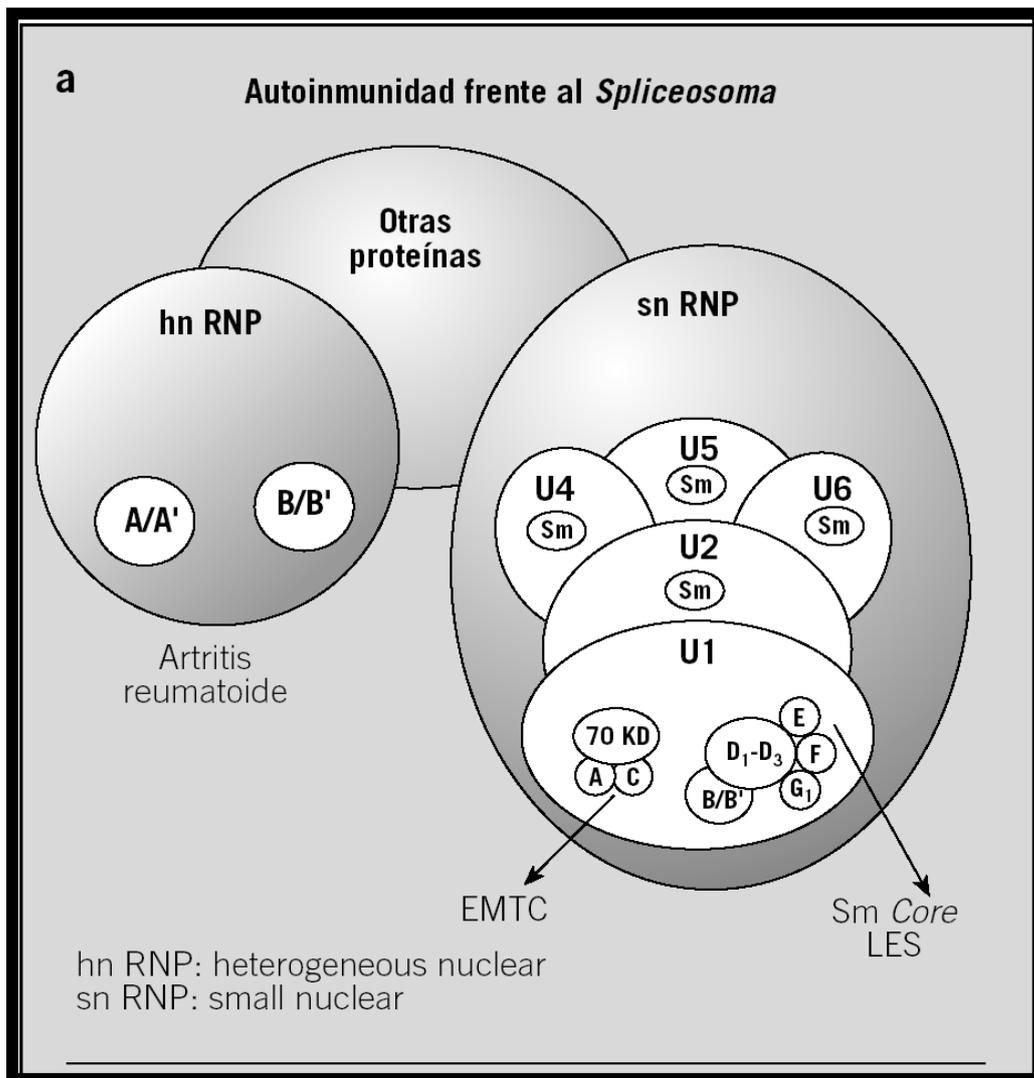


Figura 1. Los pacientes con enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC) reaccionan preferentemente contra las estructuras polipeptídicas A, C, 70 kD del U1-RNP y los pacientes con lupus eritematoso (LES) frente al antígeno Sm. El antígeno hnRNP es reactivo inmunológicamente en los pacientes con artritis reumatoide.

En las últimas décadas se ha cuestionado la existencia de la enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC) como entidad propia, debido a que algunos de los pacientes diagnosticados de esta enfermedad presentaban una conectivopatía bien definida con el paso del tiempo, especialmente lupus, esclerodermia o miositis³⁹⁻⁴¹.

Así mismo, el tradicional buen curso clínico atribuido a esta enfermedad, con preservación de órganos vitales como el riñón, parece que no es tal, ya que la fibrosis/alveolitis pulmonar y la hipertensión pulmonar aislada marcan el pronóstico⁴²⁻⁴⁴.

El marcador serológico propio, y en principio, específico de la EMTC, los anticuerpos anti-U1snRNP, también se ha observado en otras enfermedades, como la esclerodermia o el lupus, aunque con valores bajos y preferentemente del isotipo IgM⁴⁵. En los pacientes con lupus suele asociarse a los autoanticuerpos anti-Sm.

Por otra parte, la EMTC, parece que cumple 3 normas generales que permiten identificar a una enfermedad como integrante del grupo de enfermedades sistémicas autoinmunes o colagenosis:

- a. determinadas manifestaciones clínicas propias o características de naturaleza sistémica;
- b. presencia de autoanticuerpos que permiten su individualización, y
- c. existencia de genes del sistema mayor de histocompatibilidad propios o característicos de la enfermedad en cuestión.

a.3.1.- Manifestaciones clínicas

El espectro clínico de los pacientes con EMTC incluye manifestaciones clínicas propias de otras entidades, como el lupus, la esclerodermia, la polimiositis/dermatomiositis o la artritis reumatoide, lo que queda recogido en las 3 distintas clasificaciones de criterios diagnósticos de la EMTC (tabla 1)⁴⁶⁻⁴⁸.

Alarcón-Segovia et al

- A. Serológicos
 - 1. Anti-RNP por hemaglutinación, valores > 1:1.600
- B. Clínicos
 - 1. Edema en manos
 - 2. Sinovitis
 - 3. Miositis
 - 4. Fenómeno de Raynaud
 - 5. Acroesclerosis

Se requiere, para el diagnóstico, el criterio serológico más al menos 3 criterios clínicos que incluyan sinovitis o miositis

Kasukawa et al

- A. Síntomas comunes
 - 1. Fenómeno de Raynaud
 - 2. Dedos o manos «hinchados»
- B. Anti-snRNP (+)
- C. Miscelánea
 - 1. Manifestaciones lúpicas
 - a. Poliartritis
 - b. Adenopatías
 - c. Eritema facial
 - d. Serositis (pleuritis o pericarditis)
 - e. Citopenias (leucopenia o trombocitopenia)
 - 2. Manifestaciones esclerodermiformes
 - a. Esclerodactilia
 - b. Fibrosis pulmonar, restricción o disminución de la difusión
 - c. Hipomotilidad o dilatación esofágica
 - 3. Miositis
 - a. Debilidad muscular
 - b. Elevación de las enzimas musculares (creatinfosfocinasa)
 - c. Patrón miógeno en el EMG

Para el diagnóstico se precisa como mínimo uno de los dos síntomas comunes, más positividad para anti-snRNP, más 1 o más de los síntomas de miscelánea en al menos 2 de las 3 categorías

Tabla 1(a). Criterios diagnósticos y de clasificación de la EMTC.

<p>Sharp CG</p> <p>A. Criterios mayores</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Miositis, grave 2. Afección pulmonar <ol style="list-style-type: none"> a. Disminución de la capacidad de difusión < 70% b. Hipertensión pulmonar c. Vasculopatía proliferativa en la biopsia pulmonar 3. Fenómeno de Raynaud o hipomotilidad esofágica 4. Esclerodactilia o manos «hinchadas» 5. Anti-ENA > 1:10.000 y anti-RNP (+) y anti-Sm (-) <p>B. Criterios menores</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Alopecia 2. Leucopenia 3. Anemia 4. Pleuritis 5. Pericarditis 6. Artritis 7. Neuropatía del trigémino 8. Exantema malar 9. Trombocitopenia 10. Miositis leve 11. Historia de manos «hinchadas» <p>Para el diagnóstico de EMTC debe cumplir 4 criterios mayores y anti-RNP (+), o 2 criterios mayores de los 3 primeros más 2 menores y anti-RNP (+). La presencia de anti-Sm (+) se considera un criterio de exclusión</p>

EMG: electromiograma; EMTC: enfermedad mixta del tejido conjuntivo; ENA: antígeno nuclear extraíble; RNP: ribonucleoproteína nuclear.

Tabla 1(b). Criterios diagnósticos y de clasificación de la EMTC.

Algunos estudios “reclasifican” al cabo de unos años a los pacientes previamente diagnosticados de EMTC en alguna de estas entidades, un 9% como artritis reumatoide, un 15% como lupus, un 21% como esclerodermia. Este argumento se ha utilizado en contra de la individualización de esta enfermedad. Sin embargo, a los 5 años de seguimiento, más de la mitad de los pacientes inicialmente diagnosticados de EMTC sigue presentando criterios diagnósticos de ésta enfermedad^{39,40}.

Del mismo modo, el seguimiento a los 2 años de los pacientes con el marcador serológico propio de la EMTC, es decir, valores elevados de anticuerpos anti-U1snRNP, aunque sin cumplir los criterios diagnósticos de EMTC y, por lo tanto, catalogados de conectivopatía indiferenciada, evolucionan en su mayoría a EMTC definida⁴¹.

La evolución de la serie inicial de 25 pacientes –ampliada posteriormente a 34- indicó que, aunque al inicio podrían clasificarse como conectivopatía indiferenciada debido a su menor expresividad clínica, el 91% de los pacientes con anticuerpos anti-U1snRNP acabó cumpliendo criterios de EMTC tras un seguimiento a largo plazo⁴⁹. Otras series de pacientes diagnosticados de EMTC han demostrado la solidez del diagnóstico con el paso del tiempo^{50,51}.

Estos datos se resumen en la tabla 2.

Autor	n	CD	Estudio	Años de seguimiento	Anti-RNP	Diagnóstico inicial	Diagnóstico final
Van den Hoogen et al ³⁹	46	Sharp	Retrospectivo	5	CIE	EMTC (75%)	EMTC (54%)
	46	Sharp	Retrospectivo	10	CIE	EMTC (100%)	EMTC (45%)
Gendi et al ⁴⁰	32	Sharp	Prospectivo	5	CIE	UCTD (3%)	EMTC (50%)
Lundberg et al ⁴¹	46	Sharp	Prospectivo	15	ELISA	EMTC (100%)	EMTC (100%)
Burd MA et al ⁴⁹	18	Sharp	Prospectivo	3	ELISA	EMTC (100%)	EMTC (100%)
De Rooij et al ⁵⁰	26	Sharp	Retrospectivo	2	CIE	EMTC (60%)	EMTC (60%)
Snowden et al ⁵¹							

CD: criterios diagnósticos; CIE: contraelectroforesis; ELISA: enzoinmunoanálisis; EMTC: enfermedad mixta del tejido conjuntivo; UCTD: enfermedad indiferenciada del tejido conjuntivo; n: número de pacientes estudiados; RNP: ribonucleoproteína nuclear.

Tabla 2. Evolución clínica de los pacientes con EMTC

El fenómeno de Raynaud, la hipomotilidad esofágica y la artropatía, son las manifestaciones clínicas más frecuentes junto a la clásica presencia de edema de manos que da el aspecto característico de «dedos en salchicha». A pesar de la elevada prevalencia del fenómeno de Raynaud en la EMTC, los hallazgos en la capilaroscopia, a diferencia de la esclerodermia, no son especialmente demostrativos, lo que puede ayudar al diagnóstico diferencial entre ambas entidades⁵². Cualquier segmento del tubo digestivo puede afectarse, pero de forma característica lo hace el esófago⁵³⁻⁵⁵, mientras que la afectación cardiovascular más frecuente es la serositis pericárdica^{56,57}.

Si bien en las primeras series y descripciones clínicas se consideraba una enfermedad benigna con afección leve y escasa de órganos vitales, en estudios posteriores y en el seguimiento prolongado de series amplias de pacientes con esta enfermedad, la afectación pulmonar en forma de fibrosis pulmonar o como hipertensión pulmonar aislada grave, han puesto de manifiesto que no siempre el comportamiento clínico es amable y que inciden en el pronóstico de esta enfermedad⁵⁸.

Durante un seguimiento medio de 15 años, un 62% de los pacientes diagnosticados de EMTC en la serie inicial presentó una evolución favorable, pero un 38% seguía presentando actividad de su enfermedad o había fallecido, y el principal factor de mortalidad fue la hipertensión arterial pulmonar⁴⁹.

Parece ser que uno de los mecanismos patógenos implicados en esta grave manifestación de la EMTC involucra a los anticuerpos anti-U1snRNP como causantes de un incremento de las moléculas de adhesión intercelular ICAM-1, así como de la expresión de los complejos de clase II del sistema de histocompatibilidad en la célula endotelial de la arteria pulmonar, lo que incidiría directamente en la patogénesis de la hipertensión pulmonar⁵⁹. Asimismo, se ha sugerido el papel del péptido atrial natriurético como marcador pronóstico de esta grave complicación, tal y como sucede en la hipertensión pulmonar primaria⁶⁰.

Otras manifestaciones sistémicas, como la afectación del sistema nervioso central en forma de meningitis crónica o del riñón en forma de nefrosis de cambios mínimos o nefropatía IgA asociada, o afectación cutánea en forma de vasculitis livedoide, son mucho menos frecuentes⁶¹⁻⁶⁴.

a.3.2.- Alteraciones inmunológicas características:

anticuerpos anti-U1snRNP

En las enfermedades sistémicas, en general, los autoanticuerpos han sido utilizados para confirmar el diagnóstico, predecir el pronóstico o afectación orgánica, y en ocasiones como predictores del desarrollo de una enfermedad determinada⁶⁵. Los valores elevados de anticuerpos antinucleares con un patrón de inmunofluorescencia moteado y sensible a la ribonucleasa se consideran característicos de la EMTC y se deben a la presencia de anticuerpos preferentemente del isotipo IgG frente al U1snRNP, lo que constituye el marcador inmunológico propio de estos pacientes.

Los diferentes subtipos de RNP forman parte de una estructura citoplasmática, el *spliceosoma*, donde el pre-ARN mensajero se transforma y divide (*split*) en ARN mensajero (RNA m).

La respuesta autoinmune se dirige, pues, frente a distintos componentes de esta compleja maquinaria que interviene en la síntesis proteica, y presenta diferentes especificidades y reconocimiento de epítomos según sea una u otra enfermedad. Así, en el caso de la EMTC, la especificidad radica fundamentalmente en los polipéptidos 70 kD, A y C; mientras que en los pacientes con lupus la especificidad también afecta a los polipéptidos del núcleo del *spliceosoma* (B, D1, D2, D3, E, F, G) y en algunos pacientes con artritis reumatoide, la existencia de estos autoanticuerpos dirigidos contra el *spliceosoma* es mucho más heterogénea (Fig. 1)

Todo esto implica que el procesamiento del antígeno, factor importante en la amplificación de la respuesta inmune en pacientes con enfermedades del tejido conectivo, probablemente sea diferente en el lupus, la artritis reumatoide y la EMTC.

Es bien conocido que los pacientes con conectivopatías, producen una variedad de autoanticuerpos dirigidos contra componentes celulares normales, como el ADN, ARN, proteínas nucleares o citoplasmáticas; la macromolécula proteica del ARN constituye en ocasiones la principal diana de determinados autoanticuerpos, entre los que se cuentan los anticuerpos antisintetasa y los anticuerpos anti-U1snRNP⁶⁶.

Aunque el patrón de referencia en la determinación de los anticuerpos anti-U1snRNP lo constituye la inmunoprecipitación y la doble inmunodifusión, las técnicas más utilizadas por su sencillez y posibilidad de cuantificación de los resultados son las de enzimoimmunoanálisis (ELISA), donde el antígeno utilizado incluye las proteínas de 70 kD, A y C de origen recombinante. Sin embargo, en estos casos la concordancia con las pruebas de referencia es del 90%, y un 10% de los pacientes quedan sin diagnosticar.

Parece que la síntesis en laboratorio de un antígeno que incluya la proteína 70 kD y su correspondiente ARN incrementa la sensibilidad de la técnica hasta valores similares a la doble inmunodifusión⁶⁷.

Aproximadamente en un tercio de los pacientes con EMTC también se han identificado anticuerpos dirigidos frente a un ARN específico (TS1-RNA) que parecen ser buenos indicadores de la actividad de la enfermedad y se relacionan con manifestaciones clínicas asociadas con el lupus, como nefropatía o proteinúria⁶⁸.

Otros autores han relacionado la presencia de anticuerpos frente a la proteína de 70kD modificada por oxidación o apoptosis con determinadas manifestaciones clínicas, como el fenómeno de Raynaud y las lesiones cutáneas lúpicas respectivamente⁶⁹⁻⁷¹.

Es posible que en ocasiones el factor inicial causante de la aparición de estos autoanticuerpos sea una neoplasia o una infección, si bien en la mayoría de las ocasiones se desconoce⁷²⁻⁷⁴. Cabe señalar la asociación encontrada por algunos autores entre la EMTC y la infección por retrovirus, especialmente del tipo HTLV-I⁷⁵.

La historia natural inmunológica en pacientes con EMTC permite apreciar la expansión, diseminación o propagación de la reactividad inmunológica frente a diversos epítomos, en este caso frente a los diferentes polipéptidos de la fracción U1snRNP del *spliceosoma* con una posterior contracción del fenómeno inmunológico que acaba incluso con la desaparición, en algunos casos, de estos autoanticuerpos –es la llamada “contracción del epítomo”-, expresión de un inicio, curso y agotamiento de la respuesta inmune, probablemente mediada por las clonas celulares T (CD4+, Th1)^{5,49}.

El fenómeno contrario, es decir la expansión del epítopo, se ha descrito en pacientes con lupus, y al parecer podría ser responsable de los múltiples autoanticuerpos que de forma característica acompañan a esta enfermedad^{76,77}.

Muchos de estos pacientes presentan hipergammaglobulinemia, pero no se han detectado autoanticuerpos específicos de otras enfermedades autoinmunes, especialmente del lupus (anti-dsADN y anti-Sm). Cabe recordar que en los criterios diagnósticos iniciales de Sharp, la positividad para los anticuerpos anti-Sm excluía el diagnóstico de EMTC. Ocasionalmente se ha descrito la presencia de anticuerpos antifosfolípidicos (aPL) del tipo cofactor independiente, es decir no relacionados con la β_2 -glucoproteína-I y, por tanto, sin trombosis acompañante ni abortos de repetición.

También hay estudios que encuentran anticuerpos IgG anti-agalactosil, que se encuentran elevados en la artritis reumatoide (AR) en relación a su actividad inflamatoria y en otras conectivopatías. En la EMTC los valores suelen ser inferiores a los hallados en la AR pero mayores que en el lupus o la esclerodermia, relacionándose asimismo con mayor porcentaje de positividad de FR pero no con la actividad de la enfermedad⁷⁸⁻⁸⁰.

La EMTC, la artritis reumatoide y el lupus podrían agruparse nosológicamente como "*spliceosomopatías autoinmunes*", ya que tienen en común la expresión de autoanticuerpos con diferentes especificidades frente a determinados epítomos del *spliceosoma*.

a.3.3.- Predisposición genética.

Asociación con el sistema mayor de histocompatibilidad (HLA)

Tanto la genética molecular como la inmunogenética son disciplinas que han ayudado a clasificar y categorizar las enfermedades en general y las enfermedades autoinmunes en particular, por lo que son herramientas de gran utilidad en el análisis de las bases genéticas que nos hacen susceptibles a determinados trastornos⁸¹.

El estudio del sistema mayor de histocompatibilidad (*sistema de antígenos leucocitarios humanos, HLA*) y su relación con las enfermedades autoinmunes sistémicas ponen de manifiesto determinadas asociaciones.

Cada una de las enfermedades sistémicas que participan en la EMTC – lupus, esclerodermia, polimiositis/dermatomiositis y artritis reumatoide- se ha relacionado de forma más o menos constante con un HLA determinado^{82,83}. Así, el lupus se asocia principalmente con HLA-DR2 y DR3; la esclerosis sistémica con HLA-DR5; la dermatomiositis con HLA-DR3 y la artritis reumatoide con HLA-DR4. Si consideramos que la EMTC es una entidad propia, sería lógico pensar que existe una asociación predominante con un determinado HLA⁸⁴⁻⁹⁰.

Numerosos estudios han revelado una fuerte asociación con el HLA-DR4^{82,91-93}. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad que haya otros alelos relacionados con las entidades constituyentes de la enfermedad. Así, en los pacientes diagnosticados de EMTC que progresaron a esclerodermia, el HLA DR5 fue predominante⁴⁰.

Estudios inmunogenéticos realizados en otras etnias, como los mestizos mejicanos⁹⁴, demuestran la existencia de una asociación, aunque débil, con alelos específicos del HLA no encontrados en la población sana de referencia; aunque por sí sólo esto no debería ser suficiente para individualizar la enfermedad, es indudable que tiende a favorecer el concepto de enfermedad independiente⁹⁵. Recientemente en un grupo de 24 pacientes diagnosticados de EMTC en Suecia, se ha demostrado un incremento en la susceptibilidad genética a presentar una EMTC, que al parecer radica en el haplotipo MICA4/HLA-DRB1*04/TNF1 y genotipo MICA 5.1-5.1⁹⁶.

Es probable que la asociación HLA no sea específica de enfermedad, sino de antígeno, en el contexto de un mecanismo inmunopatogénico dependiente de las células T, desencadenado o conducido por autoantígenos⁹⁷. Esto explicaría, en parte, la asociación de algunos antígenos de histocompatibilidad a determinadas manifestaciones clínicas, como el DR3 y la presencia de alveolitis o fibrosis pulmonar o el DR4 y la artritis.

Tras esta revisión de la situación nosológica actual de la EMTC, en sus aspectos clínicos, inmunológicos y genéticos, quedan patentes algunos interrogantes que intentaremos contestar con el desarrollo de los objetivos de esta tesis doctoral.

Es nuestra intención, pues, aportar algo más de luz al conocimiento de esta enfermedad, la EMTC, a la que consideramos una entidad nosológica propia aunque mal conocida dentro de las conectivopatías.

b.- OBJETIVOS

- Describir las características clínicas e inmunológicas de una serie de pacientes diagnosticados de enfermedad mixta del tejido conjuntivo.
- Específicamente analizar el fenómeno de la contracción del epítipo en los pacientes estudiados.
- Determinar la importancia del sistema de histocompatibilidad mayor tanto en relación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad como en la predisposición a padecerla, y comparándolo posteriormente con la población general.
- Estudiar la concordancia entre los diversos criterios diagnósticos de la EMTC (Alarcón Segovia, Sharp, Kasuwaka).
- Definir nuevos criterios para el diagnóstico más restrictivo y específico de la enfermedad mixta del tejido conjuntivo.
- Establecer la evidencia de la EMTC como enfermedad sistémica autoinmune independiente

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

a.- PACIENTES

Los pacientes de este estudio fueron seleccionados de una base de datos, por presentar como característica común a todos ellos, anticuerpos antiU1-RNP a diferentes títulos y anti-Sm negativo por método de ELISA. Dichos pacientes estaban diagnosticados de diferentes enfermedades sistémicas y eran controlados en régimen ambulatorio en el Servicio de Medicina Interna del Hospital General Vall d'Hebron durante los últimos 20 años (período 1985-2005). Se incluyeron en el estudio a todos los que cumplían alguno de los tres grupos de criterios diagnósticos de EMTC en el momento de la entrevista.

a.1.- PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS

En todos los casos se estableció un contacto telefónico con el paciente y/o directamente con el médico responsable que lo controlaba, y se realizó un cuestionario exhaustivo donde se interrogaba personalmente al paciente sobre la presencia o no de manifestaciones clínicas relacionadas con la EMTC y recogidas en los 3 grupos distintos de criterios diagnósticos existentes para el diagnóstico de la EMTC (Sharp, Alarcón-Segovia, Kasukawa). La anamnesis incluía las siguientes cuestiones: fecha de nacimiento, edad en el diagnóstico, diagnóstico inicial, meses de evolución, presencia de edema en manos, esclerodactilia, fenómeno de Raynaud, esclerodermia proximal o distal, molestias digestivas (tales como regurgitación alimentaria, pirosis ó disfagia), debilidad muscular, afectación cutánea (exantema cutáneo, dermatitis en manos, lesiones circinadas), poliartritis, adenopatías, fiebre, clínica compatible con neurálgia del trigémino, presencia de xeroftamia ó xerostomia, fotosensibilidad, úlceras orales ó nasofaríngeas ó algún episodio de vasculitis. Se les interrogó sobre los fármacos pautados a lo largo de la evolución de la enfermedad, solicitando al paciente que explicara la respuesta clínica a los mismos, además de la sintomatología actual.

Paralelamente se revisó la historia clínica, previa solicitud al archivo del hospital general, contemplando los resultados analíticos y de las pruebas diagnósticas realizadas durante el seguimiento de la enfermedad. Se recogieron resultados analíticos tales como anemia, leucopenia o plaquetopenia, elevación de enzimas musculares, valores y actividad del complemento, velocidad de sedimentación globular (VSG), estudio de hormonas tiroideas, presencia de hipergammaglobulinemia, serologías luética y HIV, así como de VHB/VHC.

A partir de la historia clínica de archivos se recogió de forma retrospectiva el resultado de diversas pruebas diagnósticas efectuadas a lo largo de la evolución de la enfermedad, tales como capilaroscopia, tránsito esófago-gástrico-duodenal, manometría esofágica, pruebas funcionales respiratorias, TC torácica, electromiograma, ecocardiograma y RMN realizadas en cada paciente dependiendo de la necesidad diagnóstica y según las manifestaciones clínicas que presentara en ese momento.

Se valoró el estado clínico actual, en el momento de la entrevista, considerando a los pacientes asintomáticos, con molestias leves, si estas no interferían con las actividades básicas de la vida diaria, moderadas o de más difícil control y graves cuando impedían la práctica de una vida normal. Se consideró que la respuesta al tratamiento era completa cuando no existía evidencia de actividad de la enfermedad; parcial cuando se apreció una mejora en alguno de los órganos o sistemas afectados por la enfermedad; y sin respuesta cuando no se evidenció mejoría alguna.

a.2.- ESTUDIOS REALIZADOS

Al margen de las pruebas complementarias recogidas en la historia clínica, se citó a los pacientes para una entrevista clínica y se les realizó rutinariamente una radiografía de tórax, un ECG, un estudio del funcionalismo respiratorio que incluía una CVF, VEMS y DLCO junto a estudio de la función muscular diafragmática (PIM, PEM); “walking test” cuando existía un diagnóstico acompañante de hipertensión pulmonar, así como una TC torácica cuando existía por radiología de tórax o por semiología dudas sobre el diagnóstico de afección intersticial pulmonar. Se practicó un ecocardiograma a la mayoría de los pacientes con excepción de algunos casos en los que no fue posible por motivos administrativos. Se definió la presencia de afectación pulmonar en forma de neumonitis intersticial cuando la capacidad vital fue inferior al 70% del valor previsto o existía una alteración de la difusión del CO y/o existían cambios sugestivos en la radiografía de tórax o TC torácica. La hipertensión de la arteria pulmonar se clasificó en normal (< 25 mm Hg), leve (entre 25 y 45 mm Hg), moderada (entre 45 y 70 mm Hg) o grave (> 70 mm Hg) según los valores obtenidos en el registro ecocardiográfico.

De forma sistemática se practicó a todos los pacientes al mes siguiente a la entrevista un estudio analítico completo que incluía hemograma, estudio bioquímico básico y estudio inmunológico con determinación de los anticuerpos anti-Ro, La, Sm, RNP, ANA y patrón de inmunofluorescencia, anti-DNA, anti-Jo, anti-Scl70 y anticentrómero, mediante estudio rutinario en nuestro hospital (técnicas de ELISA e InmunoLia cuando fue preciso).

Así mismo, en el momento de la extracción sanguínea para estudio rutinario, se extrajeron muestras sanguíneas para estudio inmunológico mediante técnicas de inmunoprecipitación de ARN y proteínas en el laboratorio de enfermedades sistémicas de nuestro hospital.

a.3.- DEFINICIÓN DE GRUPO CONTROL

Para la obtención de un grupo control apropiado necesario para el estudio inmunogenético, acudimos al Centre de Transfusió i Banc de Teixits del Servei Català de la Salut, donde nos facilitaron para el estudio del HLA, una lista de pacientes sanos todos ellos donantes de sangre de cordón para transplante de médula ósea.

b.- MATERIAL Y MÉTODO

b.1.-METODOLOGÍA PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

Dentro de las técnicas de determinación de autoanticuerpos, describimos las utilizadas en este estudio:

b.1.1.- Inmunofluorescencia indirecta

Para la detección de los anticuerpos antinucleares, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta realizada sobre cortes criostáticos de tejido de rata. Para ello utilizamos el kit comercial de la casa Scimedx corporation según instrucciones del fabricante. Brevemente, el kit consta de Portaobjetos con 10 pocillos, en cada uno de los cuales hay fijados tejido de hígado, riñón y mucosa gástrica de rata. Este tejido se hidrata mediante un lavado en PBS durante 10 minutos. Cada pocillo fue incubado en cámara húmeda durante media hora con 30µl de los sueros problema a estudiar, diluido 1/40 en PBS, lavados e incubados de nuevo durante 30 minutos con 30µl de una solución 1/40 en PBS de IgG de conejo anti-Igs humanas, marcadas con fluoresceína (Dako). Posteriormente se lavaron de nuevo las preparaciones y se depositó sobre cada corte una gota de glicerina tamponada a pH 7,2 y el cubreobjetos. La lectura fue realizada en un Microscopio Zeiss Axioskop.

En aquellos sueros positivos se realizaron diluciones dobles progresivas hasta 1/640 para su titulación. El título de un suero es el de la mayor dilución en la que se aprecia fluorescencia específica positiva, resultando negativa la dilución siguiente.

b.1.2.- ELISA (Enzimoimmunoanálisis)

b.1.2.1.- Principio básico del test

Las muestras de suero diluidas 1:100 se incuban en la microplaca revestida con el antígeno específico. Los anticuerpos de los pacientes si están presentes en la muestra, se unen al antígeno. La fracción no unida es eliminada por el lavado en el paso siguiente. Después, se vuelve a incubar con inmunoglobulinas anti-Igs humanas conjugadas con peroxidasa de rábano (marcaje) para su detección. El conjugado no unido es retirado a través del lavado en el paso siguiente.

La adición del substrato para peroxidasa (TMB) genera una reacción colorimétrica (azul) enzimática que se detiene con ácido sulfúrico diluido (el color cambia a amarillo) cuando existe suficiente contraste entre muestras positivas y negativas. La tasa de formación de color por parte del cromógeno va en función de la cantidad de conjugado unido al complejo antígeno-anticuerpo y esto es proporcional a la concentración inicial de los respectivos anticuerpos en la muestra del paciente.

Para nuestro estudio utilizamos, Aeskulisa snRNP-C, Scl70, SS-A, SS-B, Sm y Jo-1, que es un enzimoimmunoensayo comercial en fase sólida, para la detección cuantitativa y cualitativa de anticuerpos contra el complejo snRNP (U1 RNP y Sm), Scl-70, Ro/SS-A, La/SS-B y Jo-1 en suero humano, según las instrucciones del fabricante.

b.1.2.2.- Procedimiento del ensayo:

a) Toma, manipulación y almacenamiento de las muestras

Se utilizaron preferentemente muestras de suero recién extraídas. Los sueros que tenían partículas fueron purificados por centrifugación a baja velocidad 2000 rpm 15 minutos. Las muestras de sangre se utilizaron inmediatamente o bien fueron guardadas bien cerradas a 2-8°C hasta 3 días. Las muestras se diluyeron a 1:100 con tampón de muestra (1x) mezclando bien la dilución.

b) Proceso del ensayo

Dispensamos 100 µl de cada suero diluido del paciente dentro del pocillo, controles positivo, negativo y blanco dentro los pocillos designados. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-26°C). A continuación se realizan lavados para eliminar la fracción no unida y se incuba de nuevo 30 minutos con anticuerpo anti Igs humanas conjugado con HRP. Al finalizar se lava de nuevo y se añaden 100 µl de substrato TMB, Se procede a la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente (20-26°C) en la oscuridad y se añade ácido sulfúrico 1 M como solución de parada. Por último se realizará la lectura de la absorbancia a 450 nm (Labsystems lems Reader MF, Labsystems) dentro de los 30 minutos siguientes.

b.1.2.3.-Interpretación cualitativa

Para una interpretación cualitativa leeremos la densidad óptica (DO), del blanco, de los controles y la de las muestras de los pacientes. Compararemos las DO de los pacientes con la DO del blanco y se determinará un punto de corte (*cut-off*) a partir del cual se consideran todas las muestras que presenten DO superior positivas.

b.1.3.- Inmunoensayo en “tiras” (enzimoinmunoanálisis sobre papel):

Se utilizó el kit comercial: INNO-Lia™ ANA Update (Innogenetics). Dicho Kit es un inmunoensayo en tira indicado para la detección e identificación de trece anticuerpos antinucleares (ANA): Sm (SmB y Sm-D), RNP (RNP-70 kDa, RNP-A, RNP-C), SSA (Ro52 y Ro60), SSB/La, centrómero (Cenp-B), Scl-70 (ADN topoisomerasa I), Jo-1, Ribosomal P e histonas.

Para el ensayo se utiliza una membrana de nylon, con soporte de plástico, recubierta de líneas bien delimitadas de antígenos recombinantes correspondientes a los autoantígenos descritos. Además de estos autoantígenos, se incluye una línea de control en cada tira.

Si la muestra no contiene autoanticuerpos específicos, el anticuerpo anti-humano marcado no se fija a ningún complejo autoantígeno/autoanticuerpo, con lo que sólo aparecen la línea de control.

b.1.3.1.- Procedimiento del ensayo:

Se realiza según indicaciones del fabricante, de manera similar a la descrita en el apartado anterior para ELISA, cambiando pocillos por tiras.

b.1.3.2.-Intepretación de resultados:

a) Interpretación visual:

Con el kit del ensayo, se incluye una tira para interpretación de los resultados. Se comparará la intensidad de todas las bandas presentes en la tira del paciente con las bandas correspondientes presentes en la tira de punto de corte.

b) Resultados negativos:

Una muestra será negativa a todos los marcadores cuando las intensidades de todas las bandas son inferiores a la de las bandas de referencia presentes en la tira de punto de corte, sin ser equívocas.

c) Resultados positivos:

Una muestra será positiva a un marcador concreto si la intensidad de la banda correspondiente es superior a la de la banda de referencia presente en la tira de punto de corte.

b.1.4.- Inmunoprecipitación

b.1.4.a.- Técnica de inmunoprecipitación de RNAs (IPRNAs)

Es una de las técnicas más sensibles para el aislamiento y caracterización de antígenos celulares. Se basa en la utilización de componentes celulares como fuente del antígeno a partir de los cuales mediante los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes, se precipitan los antígenos reconocidos por éstos⁹⁸.

Se utiliza para el estudio de ribonucleoproteínas, la mayoría de los autoantígenos descritos anteriormente pertenecen a este grupo. Es decir están compuestos de una parte proteica y una parte de ácido ribonucleico. Se utilizó como extracto, las células HeLa, que provienen de una paciente con adenocarcinoma de cérvix (ATCC, Manassas, VA; número CCL-2.2)

Las células fueron cultivadas a una concentración de $2-4 \times 10^5$ células/ml en medio de cultivo RPMI 1640 con L-glutamina (BioWhittaker Europe) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (BioWhittaker Europe), glutamina 2 mM (GIBCO BRL) y penicilina 100 U/ml-estreptomicina 100µg/ml (BioWhittaker Europe) y se disponen en placas de cultivo NUNC.

Con respecto a la preparación del extracto, se recolectaron las células (30 ml HeLa por cada suero problema), lavadas y resuspendidas en tampón de extracción a concentración aproximada de $2-4 \times 10^7$ cel/ml.

La suspensión celular fue sonicada (sonicador Brawn) para la liberación de los antígenos con tres pulsos de 40 segundos a 60W. La suspensión sonicada se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C (centrífuga Beckman modelo J-21) para separar el sobrenadante (extracto celular) del material insoluble.

El extracto celular se incubó durante 2 horas con Proteína A-Sepharosa unida a un suero humano normal, para retirar inespecificidad. Transcurrido este tiempo, se centrifugó el extracto durante 10 minutos a 2.500 rpm y se traspasó a un nuevo tubo. Este sobrenadante fue la fuente de antígeno.

b.1.4.a.1.- Preparación de los sueros problema (muestras) para Inmunoprecipitación

Inicialmente, fue preparada una suspensión de proteína A-Sepharosa CL 4B (Pharmacia), a una concentración de 4mg/ml en tampón de alta fuerza iónica.

Se dispusieron 500 µl de dicha suspensión junto a 10-20 µl de los sueros problema en tubos Eppendorf autoclavados. La mezcla fue incubada durante toda la noche a 4°C agitándose por rotación (o bien 90 minutos a T^a ambiente).

En este paso, las moléculas de IgG del suero se unieron a la Proteína A por su región Fc. Después de la incubación las muestras se lavaron 3 veces con tampón de alta fuerza iónica. Cada muestra fue incubada con 100 µl del extracto celular por espacio de 2 horas a 4°C en rotación continua. Pasado este período, tras un nuevo lavado en los precipitados de Proteína A-Sepharosa se encuentran los complejos antígeno-anticuerpo buscados.

b.1.4.a.2.- Extracción y estudio de los

Ácidos Nucleicos precipitados

Para extraer los ácidos nucleicos contenidos en los precipitados, se utilizó SDS (Bio-Rad), acetato sódico (Sigma), y una mezcla de fenol (Fisher), cloroformo (Merck), y alcohol isoamílico (Merck) que abreviaremos con el nombre de PCA, en proporciones 50:50:1 respectivamente (además de 0,1% Hidroxiquinolina, Bio-Rad).

Tras agitar enérgicamente en vórtex, se obtuvo una emulsión blanquecina que fue centrifugadas. De las tres fases perfectamente separadas, fue extraída la fase superior acuosa y fue transferida a unos nuevos tubos Eppendorf autoclavados a los que añadimos 3 volúmenes de etanol absoluto por volumen de solución para precipitar los ácidos nucleicos. Tras la precipitación (durante 30 minutos a -80°C , o bien toda la noche a -20°C), se recogen los ácidos nucleicos a estudiar mediante centrifugación se lavan con etanol al 70% y se dejó que los precipitados se secan al vacío. En todos los experimentos, fue preparada una muestra control de los ácidos nucleicos contenidos en 3 μl de extracto total mediante el mismo procedimiento de extracción descrito.

El residuo seco de cada tubo, se disolvió en 20 μl de tampón de muestra para su posterior estudio por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

**b.1.4.a.3.- Funcionamiento de la electroforesis en geles
de poliacrilamida-urea en el análisis de Ácidos Nucleicos**

Los geles de poliacrilamida-urea se emplean para analizar RNA y fragmentos de DNA de pequeño tamaño (<1 Kb) generalmente en condiciones desnaturalizantes de urea.

Para el análisis de los snRNA ("small nuclear RNA) y scRNA ("small cytoplasm RNA") inmunoprecipitados, fueron preparados geles de poliacrilamida al 10% conteniendo urea 7M según ha sido descrito previamente.

Para la detección de los Ácidos Nucléicos se utiliza Tinción de Plata según protocolo descrito previamente (Fig.2)

**b.1.4.b.- Técnica de inmunoprecipitación de Proteínas (IPPs)
marcadas con ³⁵S-Metionina**

Para la caracterización molecular de la parte proteica del complejo antigénico, fue utilizada la técnica de inmunoprecipitación de proteínas⁹⁹ con alguna modificación menor, empleando extractos antigénicos marcados radioactivamente en sus constituyentes proteicos.

b.1.4.b.1.- Cultivo Celular

Las células HeLa fueron cultivadas como se ha descrito en la técnica anterior. Los extractos celulares se prepararon como se describió anteriormente para la inmunoprecipitación de RNAs.

b.1.4.b.2.- Marcado Metabólico con ³⁵S-Metionina

Las células fueron cultivadas en un medio sin el aminoácido que se introdujo después en el cultivo en forma de complejo marcado (³⁵S-Metionina). Células HeLa en crecimiento continuo fueron resuspendidas en medio libre de Metionina a la concentración de $2-4 \times 10^5$ cel/ml. A este cultivo se añadieron 14,8 MBq/ml de ³⁵S-Metionina. El tiempo de marcado fue de 16-18 horas en las condiciones de cultivo habituales.

El resto de la técnica de inmunoprecipitación fue básicamente, igual al empleado para el estudio de ácidos nucleicos, con pequeñas modificaciones. En este caso, los lavados después de la incubación con las partículas de Proteína-A Sepharosa conteniendo los anticuerpos unidos al extracto, se realizaron con el tampón de alta fuerza iónica para evitar posibles uniones inespecíficas de proteínas marcadas.

Después de los lavados, las partículas conteniendo los inmunocomplejos se resuspendieron en 60 μ l de tampón de carga, que se separa en geles de poliacrilamida conteniendo SDS según la técnica descrita por Laemmli (1970), para valorar los pesos moleculares de las proteínas inmunoprecipitadas y posteriormente sometidas a fluorografía para intensificación de la señal radioactiva y secado sobre papel Watman.

Finalmente se procede al revelado (trabajando en cámara oscura) colocamos el gel de poliacrilamida-SDS seco sobre un film XRP-5 para autorradiografía (Kodak) y sobre éste una hoja de "intensify screen" (Dupont Cronex Lightining Plus A-I, Parker X Ray) (Fig. 3).

Todo este bloque se introdujo a -80°C y tras la exposición se revela la placa de autoradiografía. Los tiempos de exposición en nuestros experimentos fueron de entre 24 horas y hasta 15 días en función de la intensidad de señal de las proteínas radioactivas.

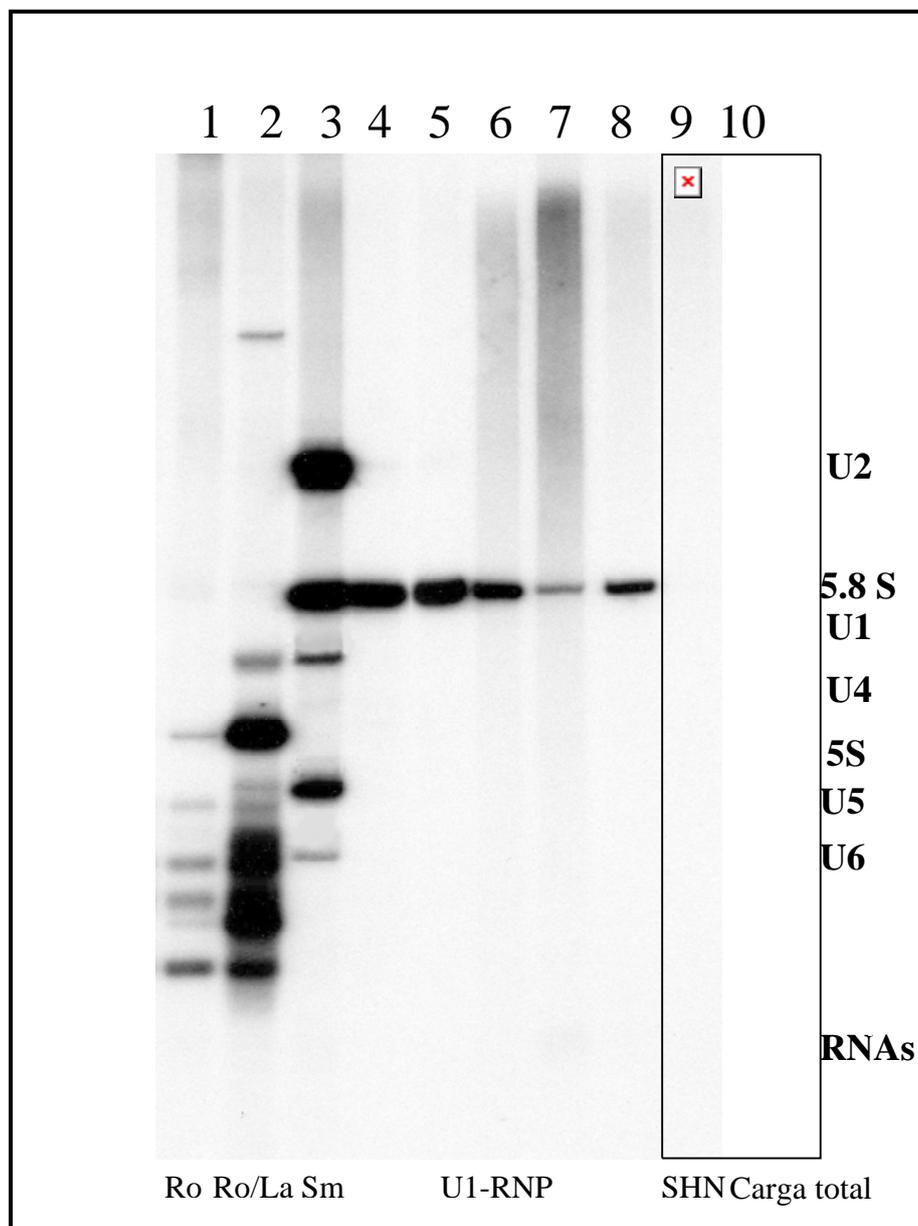


Figura 2. Inmunoprecipitación RNAs.

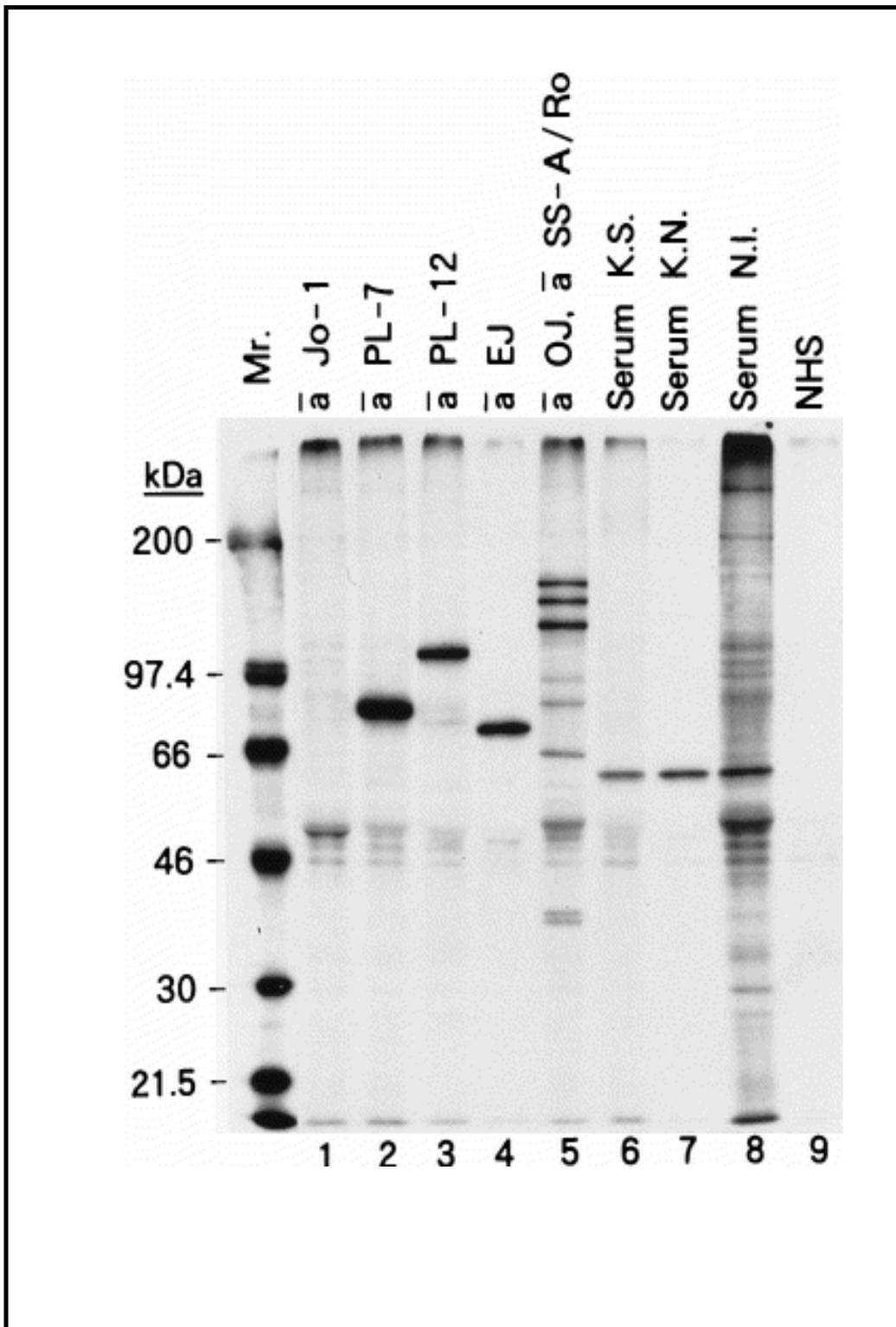


Figura 3. Inmunoprecipitación de proteínas.

b.2.- METODOLOGÍA PARA DETECCIÓN DE HLA

Para el estudio del HLA clase I, principalmente se utilizaron técnicas serológicas, mientras que para el estudio del HLA clase II se utilizaron técnicas de biología molecular.

b.2.1.- Técnicas serológicas

Para la determinación de los antígenos HLA de la superficie celular con una técnica microlinfocitotóxica dependiente del complemento, se utilizaron placas Terasaki que contienen antisueros contra los antígenos conocidos de Clase I (Placas GT-COM, GenTrak, USA). Cada pocillo de la placa contiene 1 μ l de anticuerpo y 5 μ l de aceite mineral pesado.

b.2.1.1.- Principio de la técnica

Se incuban linfocitos viables con un anticuerpo que se une al complemento. Si los linfocitos expresan un antígeno reconocido por un anticuerpo específico, la porción Fab del anticuerpo se une al antígeno, formando un complejo antígeno-anticuerpo. Una vez formados los complejos, se añade complemento de conejo. El C1q y el Calcio del complemento se unen a la porción Fc del anticuerpo. Se necesita un anticuerpo IgM o dos anticuerpos IgG para ligar una molécula de C1q.

La unión del C1q con los complejos antígeno-anticuerpo inicia la cascada del complemento que provoca la lisis celular. En una reacción negativa, los linfocitos siguen vivos. En una reacción positiva, los linfocitos mueren.

b.2.1.2.- Extracción y preparación de las muestras

Como se necesitan linfocitos viables para la tipificación serológica, la sangre se recibirá y procesará inmediatamente después de su obtención. El rendimiento de los linfocitos disminuye con el tiempo y las temperaturas extremas. La sangre se extraerá con dextrosa citrato ácido (ACD), se almacenará a temperatura ambiente (20-25°C) y se procesará antes de 48 horas para conseguir el máximo rendimiento de los linfocitos.

b.2.1.3.- Procedimiento

- 1.- Se descongelan las placas a 20-25°C durante 15 minutos y se utilizan en los 30 minutos siguientes a la descongelación.
- 2.- Se separan los linfocitos T mediante el uso de partículas paramagnéticas con el kit Dynabeads® HLA Class I (Dyna, UK).
- 3.- Se dispensa 1 µl de la suspensión de linfocitos a cada uno de los pocillos de la placa Terasaki.
- 4.- Se incuba la placa 30 minutos a temperatura ambiente.

5.- Se prepara la solución de complemento más bromuro de etidio (BE) y naranja de acridina (AO), mezclando 1 ml de complemento con 50 µl de una solución AO+BE (Ésta se prepara disolviendo 60 mg de AO y 70 mg de EB en 1 ml de etanol, par aluego añadir 49 ml de PBS).

6.- Se dispensan 5 µl de esta solución a cada pocillo de la placa.

7.- Se incuba la placa 1 hora a temperatura ambiente protegida de la luz.

8.- Se dispensan 5 µl de una solución de hemoglobina a cada pocillo de la placa. Esta solución se preparó disolviendo 10 g de hemoglobina en 100 ml de PBS con EDTA al 5% (añadir 1 ml de ácida sódica al 1%).

9.- Se procede a la lectura en el microscopio de fluorescencia de cada uno de los pocillos. Se observa la coloración de las células: las células son verdes si están vivas y son rojas si están muertas. Se asigna un número en función del siguiente criterio:

- De un 0 a un 10% sobre la mortalidad de base: 1
- De un 10 a un 20% sobre la mortalidad de base: 2
- De un 20 a un 50% sobre la mortalidad de base: 4
- De un 50 a un 80% sobre la mortalidad de base: 6
- De un 80 a un 100% sobre la mortalidad de base: 8

10.- Se deducen los antígenos HLA presentes en la muestra en base a las reacciones positivas y negativas que se han producido con la ayuda de la plantilla de los anticuerpos presentes en la placa.

b.2.2.- Técnicas de biología molecular

Para el tipaje del MICA las muestras fueron amplificadas utilizando primers específicos para el exon MICA 5, descrito en Hassan et al⁹⁶. El primer reverso fue marcado en la posición 5'-terminal con el fluorocromo 6-FAM. Los productos de amplificación microsatélite fueron sometidos a electroforesis en un Analizador Genético ABI 310 (Applied Biosystems) y fueron analizados con el software GeneMapper.

Para el tipaje de HLA-DRB1 de baja resolución se empleó la técnica de PCR-SSO usando el kit INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus (Innogenetics, Belgium). La técnica de PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotides) se basa en la amplificación de la región de DNA de interés mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) seguida de una hibridación con oligonucleótidos de DNA específicos de secuencia. Para los genes de HLA de clase II se amplifica el exón 2, marcándose de forma no radiactiva el producto de amplificación. En el caso de la PCR-SSO inversa, como es el kit INNO-LiPA, la hibridación se realiza con sondas que están conjugadas a una membrana y se revela su presencia mediante una reacción enzimática. Los procesos de hibridación y revelado se realizaron de forma automática en el aparato AutoLiPA. La interpretación de los resultados se realizó con la ayuda del programa informático LiRAS (Innogenetics).

Para la resolución de ambigüedades en los resultados de tipificación HLA, tanto de clase I como de clase II, se utilizó la técnica PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Primers). Esta técnica se basa en la reacción en cadena de la polimerasa utilizando primers de amplificación específicos de secuencia, detectándose el producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa.

Su base reside fundamentalmente en el fenómeno conocido como ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction). Un primer (cebador) de amplificación debe ser complementario a su diana (Template) para que ésta suceda realmente. La complementariedad más crítica reside en la región 3' del primer, de forma que si un primer complementario complementa a su template excepto en la base inicial 3', no permitirá que la DNA polimerasa elongue y no habrá amplificación. La interpretación de nuevo es similar a la de la serología valorando amplificaciones positivas y carencia de amplificaciones. Para controlar la falta de amplificación es necesario co-amplificar un fragmento de DNA de distinto tamaño al esperado para alelos HLA que procede de un gen no polimórfico.

b.3.- ESTUDIO ESTADÍSTICO

Dadas las características de este trabajo que estudia una enfermedad de muy baja prevalencia, el análisis realizado es de tipo exploratorio. El análisis estadístico de los datos disponibles se estructuró en los siguientes pasos: primero se realizó un estudio descriptivo univariante para detectar la presencia de errores, posibles anomalías, datos dispares, la distribución de las variables en estudio y la existencia de patrones en los datos ausentes. Se prosiguió con el análisis exploratorio bivariante para estudiar las relaciones entre variables de más interés. Dentro de este ámbito, se destaca en un punto aparte, el estudio de concordancia y correlación entre los distintos criterios diagnósticos contemplados en este trabajo, así como el análisis de la relación de los síntomas estudiados con una variable respuesta definida a partir del cumplimiento de dichos criterios. Finalmente, se recurrió al análisis de correspondencias múltiples para estudiar las relaciones multivariantes entre las variables de interés.

A continuación se detallan los pasos seguidos, así como los estadísticos y técnicas utilizados para dicho análisis.

b.3.1.- Análisis descriptivo univariante

La naturaleza de las observaciones, así como los objetivos del estudio, determina en gran parte los métodos estadísticos que se abordarán en los análisis posteriores. Así pues, al inicio de nuestro análisis, y tras la depuración de la base de datos se procedió a caracterizar las variables según su tipología (ver gráfico 1) y su distribución.

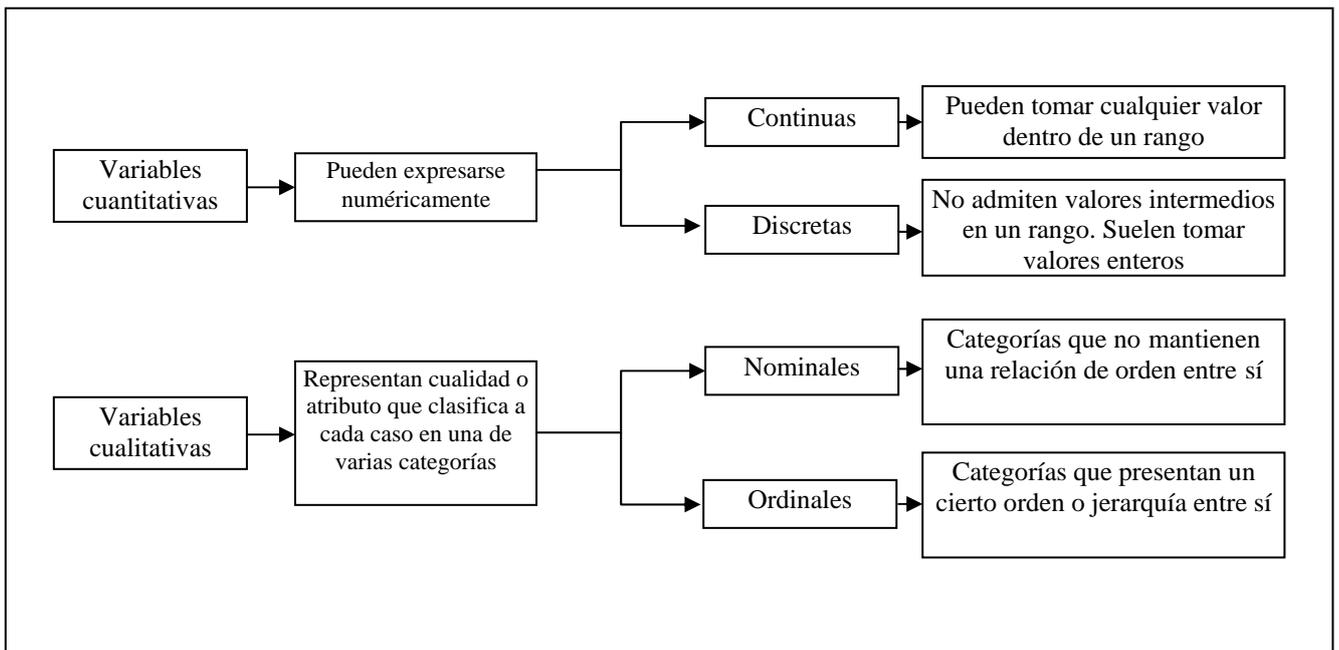


Gráfico 1. Tipología de variables según su naturaleza.

Se estudió la normalidad de las variables numéricas (cuantitativas) mediante métodos gráficos como los histogramas, diagramas de cajas (box-plots) y el uso de papel probabilístico normal (p-p plots) y métodos numéricos como el test de Kolmogorov-Smirnov. Para dichas variables, se emplearon, como medida resumen, la media y desviación estándar cuando se distribuían normalmente y la mediana y rango intercuartílico para las variables muy asimétricas o cuya distribución se desviaba de la normal.

Para la descripción de las variables categóricas (cualitativas) se usaron tablas de frecuencias, proporciones y diagramas de barras. Así mismo, se utilizaron los métodos gráficos ya descritos para analizar la posible presencia de patrones en los valores ausentes que pudieran sesgar los resultados de los análisis posteriores.

Tras la primera exploración de la base de datos, y en aquellos casos en que facilitaba el análisis y la interpretación de los resultados, se optó por categorizar algunas variables continuas y reagrupar algunas categorías de las variables cualitativas. En la siguiente tabla se muestran las variables estudiadas y su caracterización.

Variable	Tipo de variable	Categoría de variable
Variables sociodemográficas		
Edad inicio	numérica	{ 10,...62 }
Edad en el diagnóstico	numérica	{ 19,...70 }
Género	dicotómica	{ hombre, mujer }
Variables temporo-evolutivas		
Meses de evolución hasta diagnóstico	numérica	{ 1,...413 }
Meses de evolución hasta visita	numérica	{ 29,...425 }
Variables sintomáticas		
Edema de manos	dicotómica	{ si, no }
Esclerodactilia	dicotómica	{ si, no }
Fenómeno de Raynaud	dicotómica	{ si, no }
Afectación esofágica	dicotómica	{ si, no }
Poliartritis	dicotómica	{ si, no }
Adenopatías periféricas	dicotómica	{ si, no }
Fiebre	dicotómica	{ si, no }
Neuralgia del trigémino	dicotómica	{ si, no }
Síndrome seco	dicotómica	{ si, no }
Exantema malar	dicotómica	{ si, no }
Fotosensibilidad	dicotómica	{ si, no }
Úlceras orales	dicotómica	{ si, no }
Serositis	dicotómica	{ si, no }
Vasculitis asociadas	dicotómica	{ si, no }

Variable	Tipo de variable	Categoría de variable
VARIABLES FUNCIONALES		
Capilaroscopia	dicotómica	{ normal, patológica }
Pruebas funcionales respiratorias	politómica	{ normal, restrictivo ligero, moderado, grave, obstructivo }
TC torácico	politómica	{ normal, fibrosis, vidrio deslustrado, enfisema }
Electromiograma	dicotómica	{ normal, patrón miopático }
Biopsia muscular	dicotómica	{ normal, patológica }
Hipertensión pulmonar por ecocardiograma	politómica	{ normal, hipertensión pulmonar ligera, moderada, grave }
Valvulopatía por ecocardiograma	dicotómica	{ si, no }
Miocardiopatía por ecocardiograma	dicotómica	{ si, no }
VARIABLES DE LABORATORIO		
Alteración de enzimas musculares	dicotómica	{ si, no }
Afectación renal (función renal)	dicotómica	{ si, no }
Anemia	dicotómica	{ si, no }
Leucopenia	dicotómica	{ si, no }
Linfopenia	dicotómica	{ si, no }
Trombocitopenia	dicotómica	{ si, no }
Hipergammaglobulinemia	dicotómica	{ si, no }
Hipocomplementemia	dicotómica	{ si, no }
VSG	dicotómica	{ si, no }
Serología VHB	dicotómica	{ si, no }
Serología VHC	dicotómica	{ si, no }
Serología luética	dicotómica	{ si, no }
Serología HIV	dicotómica	{ si, no }
Alteración hormonas tiroideas	dicotómica	{ si, no }
VARIABLES INMUNOLÓGICAS		
Método Inmunoprecipitación		
Anti-U1-RNP	dicotómica	{ si, no }
Anti-U5-RNP	dicotómica	{ si, no }
Anti-Sm	dicotómica	{ si, no }
Anti-Ro	dicotómica	{ si, no }
Anti-RNA	dicotómica	{ si, no }
Anti-sintetasa	dicotómica	{ si, no }

Variable	Tipo de variable	Categoría de variable
Método ELISA		
ANA	dicotómica	{ si, no }
Factor reumatoide	dicotómica	{ si, no }
Anti-Ro	dicotómica	{ si, no }
Anti-La	dicotómica	{ si, no }
Anti-RNP	dicotómica	{ si, no }
Anti-Sm	dicotómica	{ si, no }
Anti-Jo	dicotómica	{ si, no }
Anti-mitochondrial	dicotómica	{ si, no }
Anti-DNA	dicotómica	{ si, no }
Anti-Scl70	dicotómica	{ si, no }
Anti-centrómero	dicotómica	{ si, no }
ANCA	dicotómica	{ si, no }
Anti-fosfolípido	dicotómica	{ si, no }
Anti-célula parietal	dicotómica	{ si, no }
Anti-microsomal	dicotómica	{ si, no }
Anti-tiroglobulina	dicotómica	{ si, no }
Anti-plaqueta	dicotómica	{ si, no }
Variable sintomatología		
Síntoma en la visita	politómica	{ asintomática, síntoma leve, moderado, severo }
Variable tratamiento		
Tratamientos en la evolución	politómica	{ corticoides +/- metotrexate, ciclosporina, ciclofosfamida, azatioprina, antipalúdicos, AINES }
Variable respuesta		
Respuesta al tratamiento	politómica	{ completa, parcial, no respuesta }
Variable éxitus		
Año de éxitus del paciente	numérica	{ 1996, 2000, 2001, 2003 }
Variable contracción epítipo		
Negativización de anti-U1-RNP	dicotómica	{ si, no }
Variable criterios EMTC		
Criterios de Alarcón-Segovia	dicotómica	{ si, no }
Criterios de Kasuwaka	dicotómica	{ si, no }
Criterios de Sharp	dicotómica	{ si, no }

Tabla 3. Caracterización de las variables estudiadas.

b.3.2.- Análisis bivalente

Una vez finalizado el estudio univariante, se estudiaron gráficamente las relaciones bivariadas que podían aportar información de interés para la descripción de la base de datos y valorar la posible existencia de interacciones y otros comportamientos no observables en el análisis univariado.

En esta misma línea, y siguiendo las sugerencias de la bibliografía previa, así como de las hipótesis generadas a partir de la práctica clínica, se decidió analizar la posible relación entre variables relevantes en el estudio de la EMTC. Para ello se construyeron tablas de contingencia para la presencia o ausencia de diversos síntomas y características en los pacientes estudiados y se analizó su nivel de asociación mediante el test de la Ji-cuadrado con el fin de evaluar si existían diferencias significativas entre los dos grupos. En aquellos casos en el que las celdas de la tabla presentaban frecuencias inferiores a 5, se realizó la prueba exacta de Fisher. Para establecer el nivel de significación se utilizó la corrección de Bonferroni, que permite evitar el problema de la multiplicidad y mantener un nivel de significación global mediante la reducción del nivel de significación para cada una de las pruebas individuales. Según esta correlación, en general, si se realizan k pruebas de significación, para mantener una probabilidad global p , el nivel de corte de la significación para cada una de las pruebas realizadas debe ser de p/k . Es decir, si por ejemplo se realizan dos pruebas de significación y se quiere mantener un nivel global de $p < 0,05$, el nivel de corte para cada una de las pruebas será $p < 0,025$. En la tabla 4 se muestran las distintas relaciones estudiadas.

Fenómeno de Raynaud	Hipertensión arterial pulmonar
Capilaroscopia patológica	Pruebas funcionales respiratorias: patrón restrictivo
Capilaroscopia patológica	Hipertensión arterial pulmonar
Afectación esofágica	Pruebas funcionales respiratorias: patrón restrictivo
Anti-U1-RNP	Hipertensión arterial pulmonar
Anti-U1-RNP	Pruebas funcionales respiratorias: patrón restrictivo
Anti-U1-RNP	Síndrome seco
Anti-Ro	Síndrome seco
Anti-Ro	Fotosensibilidad o exantema malar
HLA-DR1	Artralgias
HLA-DR3	Pruebas funcionales respiratorias: patrón restrictivo
HLA-DR3	Síndrome seco
HLA-DR4	Artralgias
HLA-DR4	Fenómeno de Raynaud
HLA-DR4	Edema de manos
HLA-DR4	Capilaroscopia patológica
HLA-DR4	Hipertensión arterial pulmonar
HLA-DR4	Pruebas funcionales respiratorias: patrón restrictivo
Factor reumatoide	Pruebas funcionales respiratorias: patrón restrictivo
Factor reumatoide	Artralgias

Tabla 4. Relación entre diversas variables en pacientes con EMTC.

b.3.3.- Estudio de asociación entre los alelos MICA y HLA

Para el estudio de los niveles de asociación entre diversos alelos del MICA-HLA y la EMTC, se dispuso de un grupo control con tantos individuos como pacientes en el grupo de la EMTC, y se representaron las frecuencias halladas en tablas de contingencia.

Se valoró mediante el test de la Ji-cuadrado si existían diferencias significativas entre los dos grupos, usando como nivel de significación $\alpha=0,05$, y la prueba exacta de Fisher para aquellos casos en el que las celdas de la tabla presentaban frecuencias inferiores a 5.

En algunos casos, y dado el pequeño tamaño de la muestra disponible, no se pudieron realizar dichas pruebas ya que el valor observado para la variable fue constante (en todos los individuos de un grupo se determinó la ausencia o presencia, de dicho alelo). Las mismas pruebas se realizaron en el análisis y comparación de los haplotipos característicos observados en pacientes con EMTC.

b.3.4.- Estudio de la concordancia entre criterios diagnósticos

Para valorar la concordancia y el nivel de acuerdo entre los tres grupos de criterios diagnósticos para la EMTC, contemplados en este estudio (Alarcón-Segovia, Kasuwaka, y Sharp), se utilizaron dos técnicas estadísticas que aunque diferentes, en el fondo estudiaban lo mismo, la correlación tetracórica y las proporciones de acuerdo específico y global. Poco utilizados por su desconocimiento, estos índices crudos de la concordancia, presentan numerosas ventajas sobre otros estadísticos más utilizados como puede ser la Kappa de Cohen¹⁰⁰ ya que no requieren la independencia entre los distintos sistemas de evaluación comparados¹⁰⁰⁻¹⁰², son independientes de la prevalencia de la característica evaluada y no requieren la asunción previa de un modelo para los datos observados ya que se trata de índices puramente descriptivos.

Dados dos criterios diagnósticos cualesquiera (tabla 5) con a, b, c y d como las frecuencias observadas para cada una de las combinaciones entre los resultados de aplicar dichos criterios.

Criterio 1	Enfermo	No enfermo	Total
Criterio 2			
Enfermo	a	b	a+b
No enfermo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N

Tabla 5. Proporciones para los resultados de combinar todos los posibles resultados de los dos criterios.

Se define como proporción de acuerdo global p_{ag} ,

$$p_{ag} = \frac{a + d}{a + b + c + d} = \frac{a + d}{N}$$

la proporción de coincidencias frente al total de sujetos. Como puede observarse, este índice por sí sólo, aunque da una idea muy útil del nivel global de acuerdo, no proporciona por sí mismo una idea del origen de dicho valor entre los dos criterios estudiados, puesto que una alta concordancia en una de las categorías, da un alto índice global, aunque el nivel de acuerdo en la otra sea muy bajo. Por ello, se estudiaron también las proporciones de acuerdo específico para cada nivel, que junto al índice anterior, proporcionan una imagen sencilla y a la vez muy informativa del nivel de concordancia y de cómo se distribuye dicho nivel según las categorías presentes.

Denominamos p_{a+} y p_{a-} a las proporciones de acuerdo específico para las evaluaciones positivas y las evaluaciones negativas respectivamente, que vienen descritas por las expresiones siguientes,

$$p_{a+} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

$$p_{a-} = \frac{2d}{2d + b + c}$$

que pueden ser interpretadas como estimaciones de las probabilidades condicionales. Por ejemplo, p_{a+} es la probabilidad que si un criterio elegido al azar da un diagnóstico positivo, también lo dé el otro criterio. En general, unos valores altos para p_{a+} y p_{a-} tomados conjuntamente, indican un acuerdo entre los criterios, mayor que el que se puede producir sólo por azar.

Por tanto, los tres índices proporcionados deben valorarse en la medida que si los tres dan valores altos, la concordancia entre los criterios analizados es elevada.

A los valores proporcionados por estos índices se añadió el resultado de estudiar la correlación entre los distintos criterios bajo estudio. Para ello, y dadas las características de las variables a comparar, es decir, variables dicotómicas, pero a priori, de una naturaleza subyacente continua, se usó la correlación tetracórica, cuya estimación se obtuvo junto a su intervalo de confianza para un nivel $\alpha=0,1$ y el valor p correspondiente.

El cálculo de la correlación tetracórica es complejo ya que ha de ser obtenido por iteración a partir de una serie infinita en r_t , que viene dada por medio de una fórmula compleja. A partir de la tabla 5 se tiene que,

$$\frac{ac - cd}{N^2 yy'} = r_t + zz' \frac{r_t^2}{2} + (z^2 - 1)(z'^2 - 1) \frac{r_t^3}{6} + (z^3 - 3z)(z'^3 - 3z') \frac{r_t^4}{24} + \dots$$

donde a,b,c y d son las frecuencias de la tabla de contingencia, N el tamaño de la muestra total, z es la puntuación estándar que divide la distribución normal en dos áreas de valores $(a+c)/N$ y $(b+d)/N$, z' es la puntuación estándar que divide la distribución normal en dos áreas de valores $(c+d)/N$ y $(a+b)/N$.

Los valores de y e y' son las ordenadas en la distribución normal correspondientes a los valores de z y z' . El signo r_t es positivo si $ad > bc$, es decir, si las concordancias superan a las discrepancias, y negativo si $ad < bc$. El signo de la correlación lo debe poner el experimentador en función del resultado obtenido.

Existen tablas que permiten obtener de forma fácil el valor aproximado de r_t conocido el valor del cociente ad/bc . En nuestro caso, para su cálculo se usó la aplicación Tetmat¹⁰³.

b.3.5.- Relación entre los síntomas y el cumplimiento de los criterios diagnósticos

Como paso previo al estudio multivariante, se evaluó la asociación bivariada entre las manifestaciones con más relevancia, inicialmente, observadas en los pacientes y la EMTC. Dado que no se está en disposición de un criterio único que pueda ser considerado como estándar de referencia para la EMTC, se creó una variable que recogiera el cumplimiento de los criterios diagnósticos según Alarcón-Segovia, según Sharp y según Kasuwaka.

Esta nueva variable dicotómica, se construyó como combinación de las tres variables, que indican presencia o no de la enfermedad, según cada uno de los criterios, de la siguiente forma: para aquellos pacientes que cumplen al menos dos de los tres criterios de clasificación, la variable toma valor 1, mientras que para los que sólo cumplen un criterio de clasificación la variable pasa a valer 2. De esta forma se distingue a los pacientes según la fuerza con la que podemos afirmar que presentan la enfermedad, dando por supuesto que el hecho de cumplir dos o más criterios apoya con más fuerza la hipótesis de presentar la enfermedad respecto al resto de pacientes. Para determinar la significación de la prueba de asociación, se optó por la prueba exacta de Fisher, en vez de la Ji-cuadrado, por tener un rendimiento mejor para muestras pequeñas. Se distinguió entre dos niveles de corte para la significación estadística según el objetivo perseguido.

Con el fin de valorar la importancia de la asociación bivariante, se optó por un valor de $p=0,05$, mientras que para determinar si dicha variable debería ser incluida en los estudios multivariantes posteriores, se siguieron las recomendaciones propuestas por Hosmer y Lemeshow¹⁰⁴ eligiendo un nivel de corte menos restrictivo de $p=0,25$.

Cabe destacar, que para facilitar el análisis en algunos casos, y siempre que clínicamente tuviera sentido, se optó por reagrupar categorías que presentaban muy pocos individuos; éste fue el caso de la variable hipertensión arterial pulmonar, donde se distinguió entre presentarla o no, sin diferenciar en el grado de afectación de la misma, o de las pruebas funcionales respiratorias que fueron clasificadas inicialmente en no afectación o afectación leve, moderada o grave, y que para dicho estudio fueron reagrupadas en tres categorías, no afectación, patrón restrictivo leve-moderado y grave.

b.3.6.- Análisis multivariante: correspondencias múltiples

Uno de los objetivos de nuestro estudio sobre pacientes con EMTC, es proporcionar un nuevo conjunto de criterios, donde estén reflejados aquellos aspectos de la enfermedad que con más frecuencia o especificidad están presentes en nuestra población problema y que además presenten un mayor nivel de acuerdo con los criterios diagnósticos previamente propuestos en la literatura, con el fin de unificar criterios y proporcionar un instrumento útil a la práctica clínica en nuestro centro hospitalario.

Para ello, se requiere de técnicas multivariantes complejas que permitan tratar nuestras variables de carácter categórico de forma gráfica y numérica, simplificando al máximo la información disponible para que ésta pueda ser usada de forma sencilla y práctica posteriormente. Dada la naturaleza exploratoria de nuestro estudio se decidió utilizar el llamado Análisis de Correspondencias Múltiples (ACM).

El Análisis de Correspondencias es una técnica estadística cuya finalidad es poner de manifiesto gráficamente las relaciones de dependencia existentes entre las diversas modalidades de dos o más variables categóricas a partir de la información proporcionada por sus tablas de frecuencias cruzadas.

El nombre parte de la escuela francesa de los llamados métodos multidimensionales, más concretamente de la traducción directa del término “Analyse des correspondances”, propuesto hace más de 30 años por Benzecri¹⁰⁵ para aplicaciones en el campo de la lingüística.

Es importante tener en cuenta el origen idiomático de esta denominación, pues nos da la clave de la idea principal en la que se basa esta técnica: el término “correspondances” debe entenderse como “sistema de asociaciones” entre conjuntos de variables, de ahí que el análisis de correspondencias entienda que, de la misma manera que el significado de una palabra se puede descubrir por su contexto, las características de una variable (en nuestro caso EMTC) pueden ser explicadas a través de sus asociaciones con las otras variables en estudio.

La principal ventaja de estos métodos es que permiten representaciones gráficas de grandes volúmenes de datos (en nuestro caso el número de variables recogidas llega a 126) de forma sintética debido a su capacidad para reducir la dimensionalidad del problema en estudio. La justificación para esta reducción se basa en que, en el análisis de tipo exploratorio, se tiende a recoger gran cantidad de información (difícil de asimilar e interpretar), por lo que un gran número de variables están muy correlacionadas (aportando información muy parecida y por tanto, redundante).

Así pues, el análisis de correspondencias permite extraer las tendencias más destacadas, jerarquizarlas y eliminar los efectos marginales o puntuales que perturban la percepción global de los hechos recogidos en los datos¹⁰⁶.

A nivel conceptual (para una descripción formal de los métodos estadísticos, computacionales y sus aplicaciones ver Greenacre¹⁰⁷), el análisis de correspondencias parte de las filas y columnas de una tabla de contingencia (ver Tabla 6) para mostrarlas gráficamente como puntos en un espacio de dimensión menor, de manera que la posición de los puntos en el gráfico muestre las asociaciones entre los niveles de las variables que se observan en la tabla.

Veamos un ejemplo partiendo de nuestros datos: en la tabla 6 se muestra la relación observada en nuestra muestra entre los 5 niveles de las pruebas funcionales respiratorias (PFR) y los 4 niveles de hipertensión arterial pulmonar por ecocardiograma (HTAP). En este caso, la asociación observada entre las dos variables viene recogida por las frecuencias observadas en las celdas de la tabla (x_{ij}) y podemos medir la magnitud de dicha asociación mediante el cálculo del estadístico de la Ji-cuadrado.

		PFR				
		Normal	Restrictivo ligero	Restrictivo moderado	Restrictivo grave	Obstrutivo
HTAP	Ausencia	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}
	Ligera	X_{21}	X_{22}	X_{23}	X_{24}	X_{25}
	Moderada	X_{31}	X_{32}	X_{33}	X_{34}	X_{35}
	Grave	X_{41}	X_{42}	X_{43}	X_{44}	X_{45}

HTAP: hipertensión arterial pulmonar; PFR: pruebas funcionales respiratorias.

Tabla 6. Tabla de contingencia para la PFR y la HTAP. Las x_{ij} indican la frecuencia (número de pacientes) para cada combinación de modalidades.

Imaginemos, ahora, que los 5 valores de las columnas (x_{11} , x_{12} , x_{13} , x_{14} , x_{15}) para la primera fila son coordenadas en un espacio 5-dimensional y dibujamos según estas coordenadas un punto en dicho espacio que representa toda la fila. Podemos proseguir de la misma manera para el resto de las filas teniendo al final 4 puntos representados.

Si calculamos la distancia entre los 4 puntos, podemos decir que estas distancias resumen toda la información sobre las semejanzas entre las filas de la tabla. Una vez llegados a este punto, es fácil ver, que si somos capaces de hallar una representación en un espacio de dimensión menor de los puntos que representan las filas de nuestra tabla, de manera que retengamos la mayor información posible sobre las semejanzas entre las filas, podemos representar toda la información de la tabla en un espacio de dimensión muy baja (1,2,3 dimensiones) que nos permita una visualización más sencilla (hemos pasado de un espacio con 5 dimensiones, difícil de visualizar, a un gráfico en un plano -2 dimensiones - fácil de interpretar).

Aunque todo este proceso no tiene mucho sentido para una tabla pequeña como la que acabamos de mostrar, es muy útil cuando empezamos a aumentar el número de dimensiones (columnas) que debemos estudiar. En el caso más simple, el del llamado Análisis de Correspondencias Simple (ACS), se tienen tablas de dos variables como la que acabamos de ver, y el aumento de la dimensionalidad del espacio original viene dado por el incremento en el número de categorías de cada una de las variables estudiadas.

En nuestro caso, el aumento viene producido por el gran número de variables estudiadas, con lo que se requiere un instrumento matemático mucho más complejo (ACM), aunque la idea subyacente y la interpretación de los resultados se deriva de lo visto para el caso del ACS.

A tener en cuenta que para llevar a cabo el ACM, necesitaremos determinar qué variables de las que disponemos para el estudio, van a ser las variables activas y cuáles las ilustrativas. La diferencia entre unas y otras radica en que las variables activas son las que nos aportarán información (son las que forman los ejes o factores) mientras que las ilustrativas, como dice la palabra, ilustran los resultados, ayudándonos por tanto, a comprender mejor la representación gráfica del análisis.

A la hora de interpretar los resultados gráficos, debemos quedarnos con la idea que dos puntos cercanos representan dos modalidades (categorías) con perfiles parecidos (los pacientes con dichos valores se parecerán en los valores que presentan para el resto de variables). Es decir, que su asociación será mayor que la esperada si las modalidades fueran independientes (sin asociación). También observamos que los puntos más alejados del origen de coordenadas son aquellos cuyo perfil se aleja más del resto de las variables, pues se entiende que el centro representa el perfil “promedio” de todos los casos.

Llamamos inercia, a la información sobre las asociaciones entre filas que tiene el espacio original. Así pues, cuanto mayor sea la inercia del espacio de menor dimensión que elegimos para la representación, mejor estaremos reflejando las distancias entre las modalidades estudiadas.

Una vez determinadas aquellas variables que por el ACM, nos aportaban una mayor información para la clasificación de los pacientes, nos pareció importante determinar qué número de estas variables debían de ser exigidas por el criterio de clasificación, para que estos nuevos criterios diagnósticos fueran realmente útiles y fiables. Para ello fue necesaria la creación de un tabla donde por una parte se expresaban las diferentes variables que habían sido determinadas previamente en el estudio de correspondencias, y a cada una de las posibles combinaciones dando el valor de la variable cumplimiento o no, es decir, se determinó para una determinada combinación de variables cuántos pacientes serían clasificados por 2 ó más grupos de criterios para cada combinación. Tras obtener dichos resultados, se calcularon aquellas posibles combinaciones, que aportaban un mayor porcentaje de cumplimiento, equiparando dichos resultados con la práctica clínica.

RESULTADOS

a.- ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA SERIE CLÍNICA

El grupo de estudio estaba formado por una serie histórica de 55 pacientes positivos para anti-RNP por método de ELISA, que acudieron a las consultas externas del servicio de Medicina Interna, donde se llevó a cabo la anamnesis, exploración física y se les practicó una serie de pruebas diagnósticas, con el fin de disponer de la máxima información posible y catalogarlos de forma correcta en el grupo de pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo. Solamente se incluyó a los pacientes que en el momento de la entrevista cumplían alguno de los 3 grupos de criterios existentes para el diagnóstico y clasificación de la EMTC.

El grupo de pacientes estaba formado por 30 (78%) mujeres y 8 (22%) hombres, con una edad media (DE) de 33,92 años (15,5) – mediana de 31 (RI 20-47,75), y dos picos de frecuencia, uno a los 20-30 años y otro más tardío entre los 45-55 años. El seguimiento medio de la serie fue de 5,5 años.

Como puede observarse en el gráfico 2, la edad se distribuye muy alejada de la normal, lo que justifica la elección de la mediana (en vez de la media) para resumir la tendencia central de esta variable.

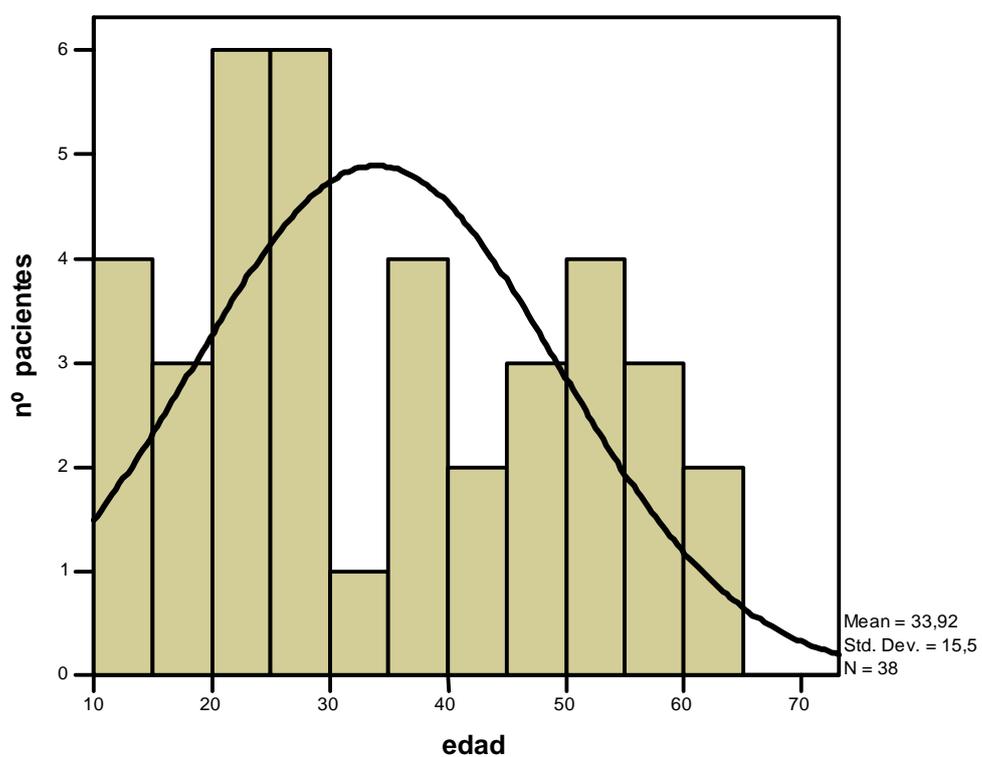


Gráfico 2. Representación de la variable edad.

Se analizó el tiempo transcurrido entre el inicio de la clínica y el momento del diagnóstico de enfermedad mixta del tejido conectivo. Algunos pacientes no fueron diagnosticados hasta que no fueron valorados en nuestra consulta. Se obtuvo una mediana de 96 meses (RI 12-201). En este caso se puede ver una clara asimetría hacia la izquierda de los valores observados.

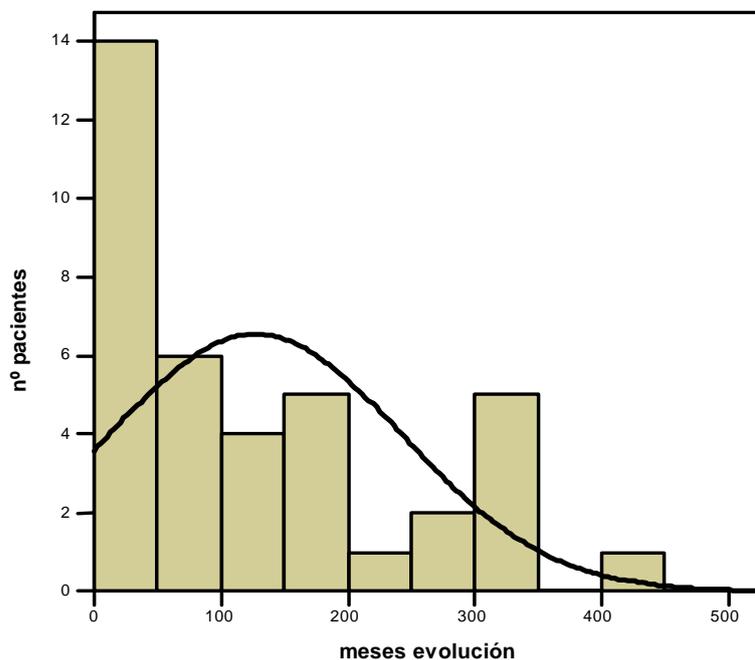


Gráfico 3. Representación de la variable meses de evolución hasta el diagnóstico de la enfermedad.

Con respecto a la mortalidad se detectaron 4 éxitos, lo que representa un 10% de la serie. En un sólo caso se atribuyó a la propia enfermedad, siendo la causa del éxitus la insuficiencia cardíaca con disfunción de la conducción cardíaca y arritmia letal. El cáncer fue la principal causa de muerte en estos pacientes, dos neoplasias de pulmón (en pacientes fumadores) y una neoplasia gástrica.

En el estudio de las manifestaciones clínicas al inicio de la enfermedad, tal y como se expone en el gráfico 4, se observa como las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron el fenómeno de Raynaud (29%), las artralgias-artritis (26%), seguido de la presencia de disnea (16%).

En 4 pacientes no se pudo obtener dicha información dado que habían fallecido, y las manifestaciones clínicas al inicio del cuadro no estaban adecuadamente recogidas en la historia clínica.

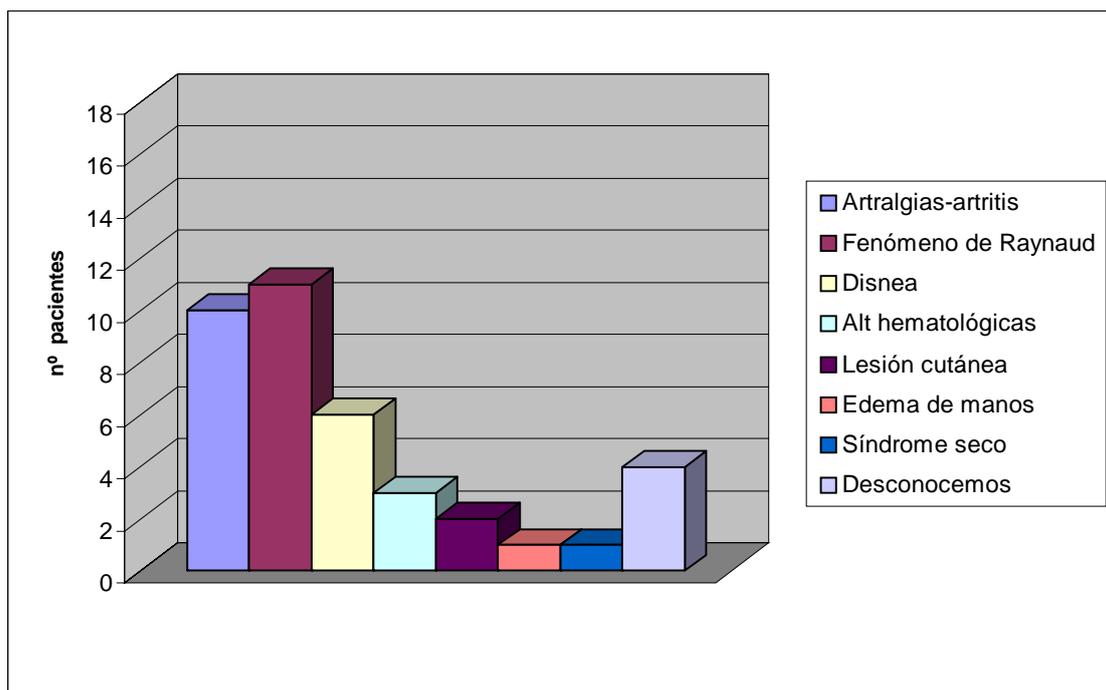


Gráfico 4. Clínica de debut de los pacientes con EMTC.

En el grupo de pacientes estudiado, encontramos 16 (42%) pacientes que desde el inicio de los síntomas hasta el momento de ser valorados en nuestro servicio, habían sido diagnosticados de otra conectivopatía, cumpliendo en el momento de la visita uno, dos o los tres criterios diagnósticos de enfermedad mixta del tejido conectivo. Así, 5 pacientes estaban diagnosticados de esclerodermia, 8 pacientes de lupus eritematoso sistémico, 1 paciente de síndrome de Sjögren, 1 paciente de artritis reumatoide y 1 paciente de artropatía inespecífica. Dichos resultados se representan a continuación (gráfico nº 5).

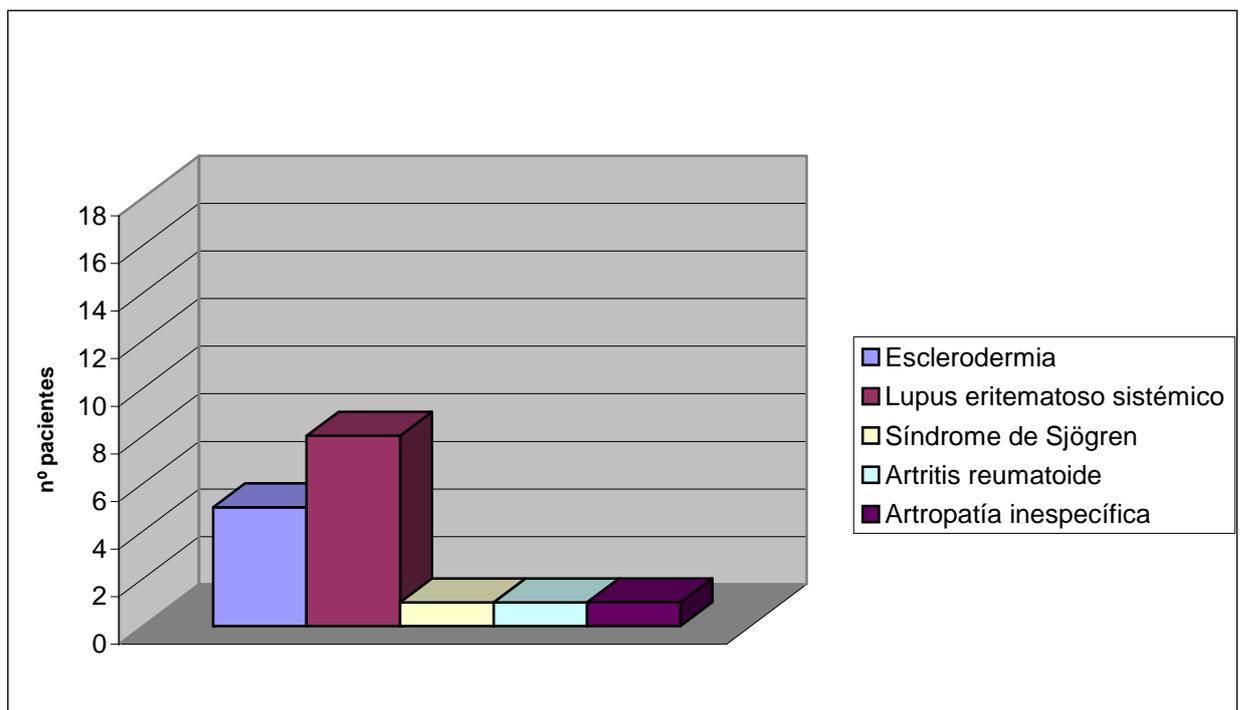


Gráfico 5. Pacientes con EMTC diagnosticados de otras conectivopatías.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes a lo largo de la enfermedad, fueron las siguientes: poliartritis, fenómeno de Raynaud, edema de manos y debilidad muscular. Un 84% de los pacientes estudiados presentó alteraciones capilaroscópicas, si bien inespecíficas.

Fotosensibilidad, úlceras orales, fiebre o exantema malar, todas ellas manifestaciones clínicas presentes en los criterios diagnósticos del lupus también fueron observadas en un número no despreciable de pacientes, tal y como se puede apreciar en la tabla 7. Ello explicaría que algunos de estos pacientes estuvieran catalogados inicialmente de lupus.

La afectación del tracto gastrointestinal atribuible a la EMTC se circunscribió fundamentalmente al esófago. La práctica de un estudio manométrico del esófago permitió detectar en 15 pacientes (39%) dismotilidad esofágica con afectación predominante de los 2/3 inferiores del esófago e hipotonía del esfínter esofágico inferior en 3 pacientes. La presencia del síntoma clínico de disfagia se recogió en sólo 3 pacientes. Una paciente presentó afectación gástrica en forma de dispepsia intratable y precisó dosis elevadas de inhibidores de la bomba de protones y glucocorticoides para su control.

Para la valoración de la afectación muscular, se analizó la clínica- mialgias o debilidad muscular-, la alteración de los enzimas musculares (creatin fosfoquinasa y aldolasa), el estudio electrofisiológico y, en algunos casos, la biopsia muscular. Se detectaron 22 pacientes (57%) con afectación muscular, 15 con elevación de las enzimas musculares, 8 pacientes con afectación en el electromiograma y 5 pacientes con afectación de la biopsia muscular realizada.

Se detectó la presencia de síndrome seco en 19 pacientes (50%) cursando con xerostomía y xeroftalmia.

La fiebre, aunque no fue una de las manifestaciones más frecuentes, - menos de la mitad de los pacientes estudiados- se detectó principalmente durante los brotes de la enfermedad, coincidiendo con la presencia de hipergammaglobulinemia y elevación de la VSG.

Ocho pacientes presentaron manifestaciones de vasculitis, durante la evolución de la enfermedad; en 3 pacientes de origen cerebral y en 5 pacientes vasculitis cutánea leucocitoclástica.

Con respecto a la afectación cutánea, hallamos diversas manifestaciones: lesiones tipo dermatomiositis en 2 pacientes, eritema generalizado en 4 pacientes, úlceras cutáneas en 2 pacientes, telangiectásias en 5 pacientes, telangiectásias asociadas a livedo reticularis en 2 pacientes, eritema nodoso en 1 paciente y lupus discoide en 2 pacientes.

También se recogieron las manifestaciones hematológicas más frecuentes en los pacientes con EMTC. Se objetivó la presencia de anemia normocítica normocrómica en 12 pacientes, leucopenia en 7 y linfopenia en 10 pacientes. La presencia de trombocitopenia se recogió en 5 pacientes, con tan sólo 1 caso asociado a anticuerpos antiplaqueta, no siendo en los otros casos posible su determinación.

Otras manifestaciones evidenciadas en la anamnesis fueron: alopecia en 3 pacientes, alteración de la conducción cardíaca en 1 paciente, hipotiroidismo autoinmune en 2 pacientes, gastritis crónica atrófica en 1 paciente, cirrosis criptogénica en 1 paciente y parotiditis de repetición en 1 paciente.

Variables	Si	No	No conoce
Poliartritis	33	5	0
Fenómeno de Raynaud	32	6	0
Edema de manos	30	8	0
Debilidad muscular	22	16	0
Xeroftalmia i/o xerostomía	19	19	0
Afectación cutánea	18	19	1
Fiebre	17	21	0
Esclerodactilia	16	22	0
Fotosensibilidad	15	23	0
Úlceras orales	13	25	0
Disnea	11	27	0
Exantema malar	11	27	0
Serositis	10	28	0
Esclerodermia	8	30	0
Vasculitis asociadas	8	30	0
Neuralgia trigémino	5	33	0
Disfagia	3	35	0

Tabla 7. Manifestaciones clínicas en pacientes con EMTC.

Dado que una de las afecciones que parecen marcar el pronóstico en los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo es la afectación pulmonar se estudió el funcionalismo pulmonar del paciente, mediante la práctica de pruebas funcionales respiratorias. Así la afectación pulmonar se definió como la presencia de un patrón restrictivo o menos del 70% del valor previsto en la capacidad vital o alteración de la difusión del monóxido de carbono (DLCO).

Se realizaron las pruebas funcionales respiratorias en 34 pacientes. En 5 pacientes no se apreciaron alteraciones, en 29 pacientes se detectó trastorno del funcionalismo pulmonar, objetivándose en 28 pacientes trastorno restrictivo, en 18 pacientes ligero y en 10 pacientes moderado-grave, de los cuales 18 presentaban descenso del DLCO. En 1 paciente se halló patrón obstructivo, siendo éste fumador.

Posteriormente se estudiaron las imágenes tomográficas de tórax realizadas en 19 pacientes (la TC torácica se realizó en la mayoría de los casos si existía clínica respiratoria o afectación del funcionalismo pulmonar). Se detectaron 14 pacientes con alteración de la TC, en 13 pacientes con un patrón de fibrosis y un caso compatible con enfisema pulmonar.

También se realizó un estudio ecocardiográfico para valorar, principalmente, la presencia de hipertensión arterial pulmonar, siendo esta afectación la causa principal de muerte en los pacientes con EMTC, y por tanto la afectación que marca el pronóstico de la enfermedad. Se realizó en 27 pacientes, de los cuales 15 no presentaron alteraciones, detectándose en 7 (18%) pacientes hipertensión arterial pulmonar, en 2 ligera, en 2 moderada y en 3 grave (gráfico nº 6); en 9 pacientes se apreció alteraciones en las válvulas cardiacas, tales como insuficiencia mitral, insuficiencia aórtica, insuficiencia tricuspídea, estenosis mitral, estenosis aórtica y en un paciente una mitral mixoide; en 3 pacientes se detectó afectación miocárdica, en 2 casos en forma de miocardiopatía hipertrófica y en un caso de miocardiopatía dilatada.

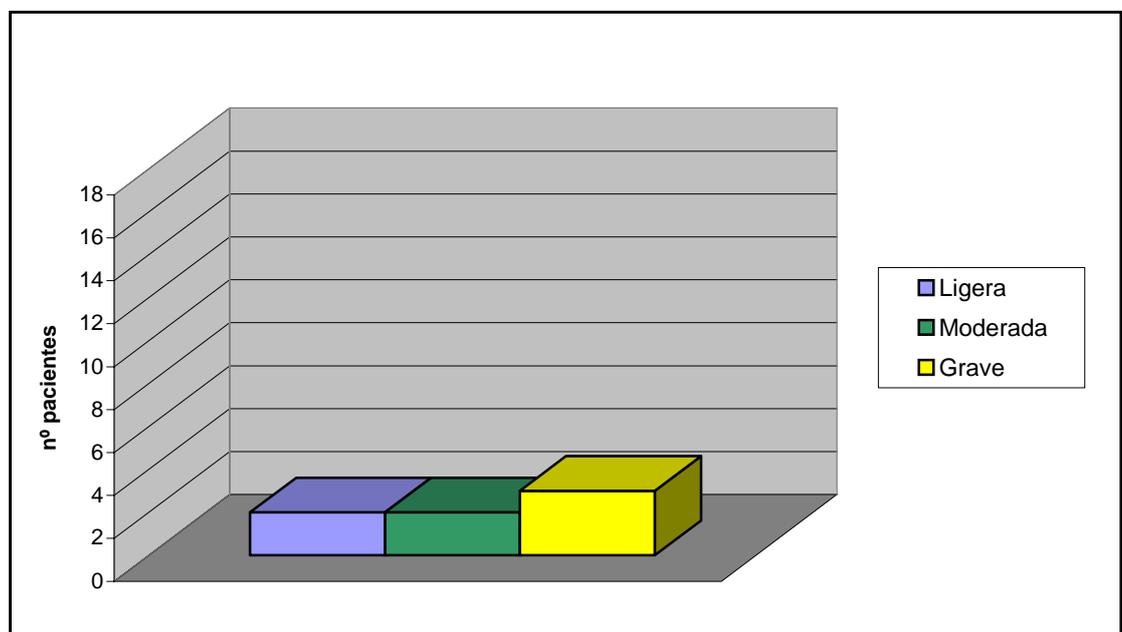


Gráfico 6. Hipertensión arterial pulmonar en pacientes con EMTC.

La afectación renal en los pacientes con EMTC es infrecuente. En nuestro grupo de pacientes detectamos 5 pacientes con afectación de la función renal (gráfico nº 7), cursando en un caso con insuficiencia renal crónica de etiología no filiada, 2 pacientes con síndrome nefrótico en los que no se llevó a cabo estudio histológico, un paciente en forma de glomerulonefritis mesangial y otro caso como glomerulonefritis membranosa, diagnóstico realizado tras la práctica de una biopsia renal.

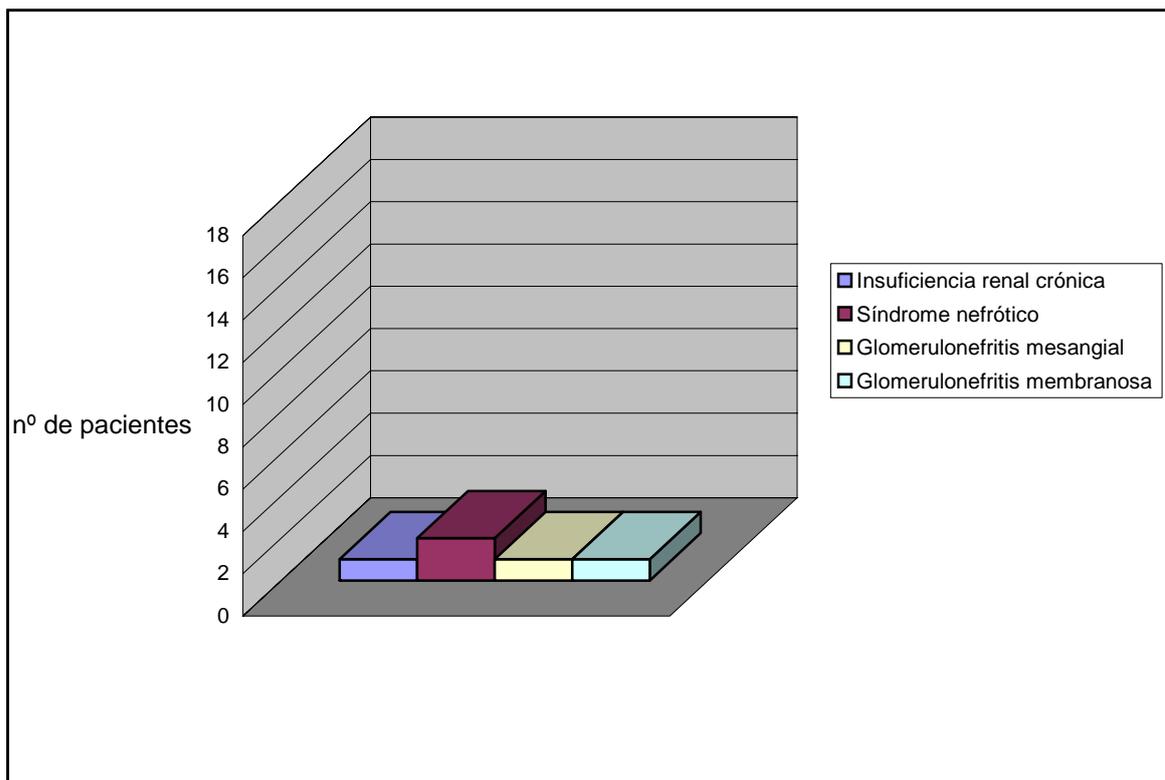


Gráfico 7. Manifestaciones renales en pacientes con EMTC.

En el momento de la entrevista, se valoró el estado clínico actual, es decir si estaban asintomáticos; si presentaban síntomas leves, considerándose así a aquellos que referían no interferir con las actividades básicas de la vida diaria; síntomas moderados, aquellos de más difícil control o síntomas graves, aquellos que impedían una vida normal. Hallamos que de los 38 pacientes valorados, 15 estaban asintomáticos; 11 presentaban síntomas leves (1 paciente neuralgia del trigémino, 2 pacientes astenia, 4 pacientes artralgias, 4 pacientes disnea); 6 pacientes presentaban síntomas moderados (1 paciente con artralgias, 5 pacientes con disnea); finalmente en 2 pacientes los síntomas eran tan importantes que dificultaban una vida normal por presentar disnea al mínimo esfuerzo. Cuatro pacientes no fueron valorados por éxitus. Estos resultados se recogen en el gráfico nº 8.

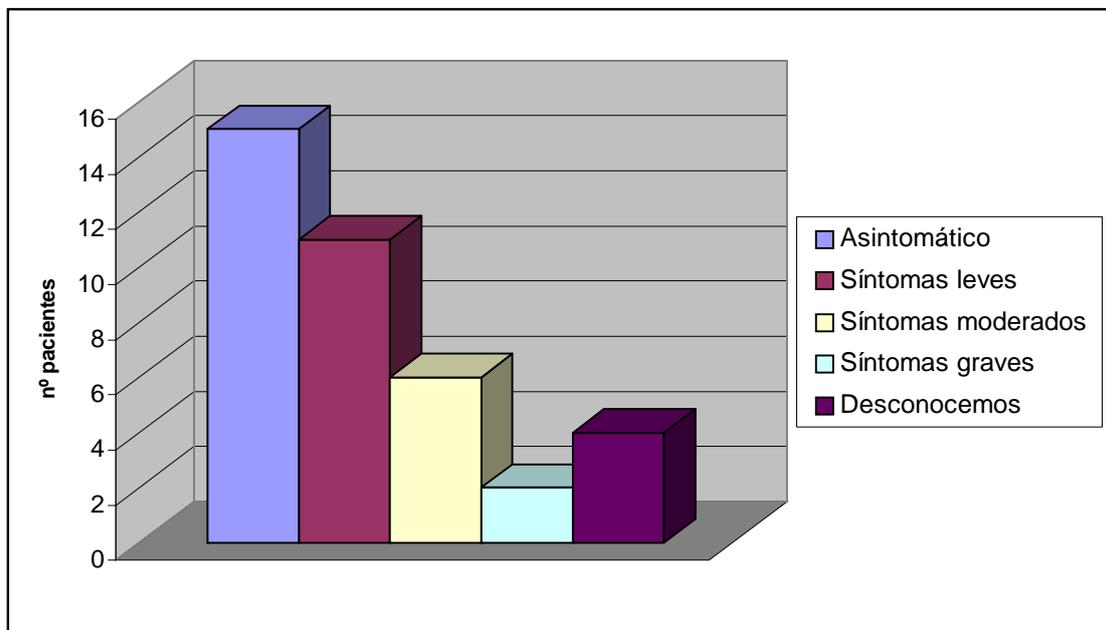


Gráfico 8. Síntomas de los pacientes con EMTC en la evaluación actual.

En cuanto a la respuesta al tratamiento se establecieron varios grupos. Se consideraron aquellos pacientes que habían recibido tratamiento con glucocorticoides de forma aislada, aquellos pacientes que habían precisado de glucocorticoides y antimaláricos (sobretudo en pacientes con afectación articular que no respondían a AINES y glucocorticoides); y aquellos que habían necesitado asociar al glucocorticoide un inmunodepresor. Los inmunodepresores más utilizados en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes pertenecen a tres grupos: fármacos alquilantes (ciclofosfamida), análogos de las purinas (azatioprina) y antagonistas del ácido fólico (metotrexato).

Estas sustancias interfieren en eventos celulares imprescindibles para la proliferación celular, siendo particularmente activos sobre las células que se dividen rápidamente, por lo que también se utilizan en enfermedades neoplásicas. En las enfermedades autoinmunes se utilizan en dosis menores, y si bien se cree que su acción terapéutica se ejerce a través de la citotoxicidad sobre elementos inmunes, también presentan efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores.

De los 38 pacientes estudiados, 12 fueron tratados únicamente con glucocorticoides presentando una respuesta completa o parcial; 11 recibieron glucocorticoides y antipalúdicos, de los cuales 5 presentaron una respuesta completa, 5 una respuesta parcial y uno no respondió al tratamiento; el resto de pacientes fueron tratados con glucocorticoides e inmunodepresores, en algunos casos precisando más de un inmunodepresor.

Así, 14 pacientes fueron tratados con glucocorticoides e inmunodepresores presentando entre éstos respuesta completa 6 pacientes y parcial 7 pacientes, no respondiendo un paciente. Estos resultados se recogen en el gráfico nº 9.

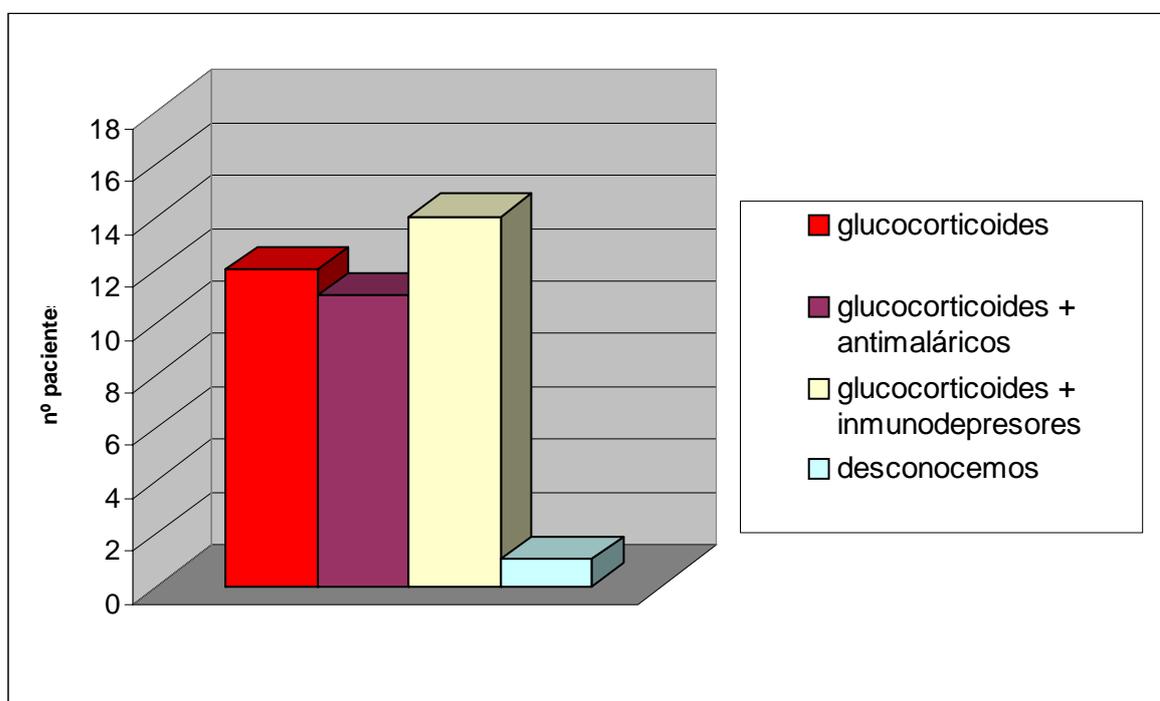


Gráfico 9. Tratamientos administrados en los pacientes con EMTC.

b.- ESTUDIO INMUNOLÓGICO Y ANALÍTICO

En relación a los datos inmunológicos, se utilizaron para la detección de autoanticuerpos los siguientes métodos (ya explicados en apartados previos):

Enzimoimmunoanálisis (ELISA) -en la detección inicial-, e Inmunoensayo en “tiras” (enzimoimmunoanálisis sobre papel o ELISA sobre papel) e Inmunoprecipitación (ARN y proteínas), en el momento del control.

Los resultados que se exponen en las tablas 8 y 9, son los resultados obtenidos en el suero del momento del control, por lo que existen 4 casos en los que no se pudieron realizar dichas determinaciones por ser éxitus.

Cabe destacar que los anticuerpos antinucleares estaban presentes en todos los pacientes, observándose un patrón nucleolar en 2 pacientes y el patrón típico moteado en el resto de los casos.

Los anticuerpos anti-RNP detectados por la técnica de ELISA en el momento de la inclusión, fueron positivos en todos los pacientes, no siendo así en el control posterior (25 pacientes), y detectándose en 4 pacientes anti-Sm positivos.

En cambio, por la técnica de inmunoprecipitación, tan sólo se detectaba positividad para el U1-RNP en 22 pacientes y siendo el anti-Sm positivo en 5 pacientes.

	Positivo	Negativo	No realizado
Anticuerpos antinucleares	34	0	4
Anticuerpos anti-RNP	25	9	4
Anticuerpos anti-Ro	12	22	4
Anticuerpos anti-DNA	5	29	4
Anticuerpos anti-Sm	4	30	4
Anticuerpos anti-La	4	30	4
Anticuerpos p-ANCA	4	5	29
Anticuerpo antitiroglobulina	3	31	4
Anticuerpo antimicrosomal	3	31	4
Anticuerpos antimitocondrial	2	32	4
Anticuerpos anticélula parietal	2	32	4
Anticuerpos antiplaqueta	2	1	35
Anticuerpos antifosfolípido	1	33	4
Anticuerpos anti-Sc170	1	33	4
Anticuerpos anti-Jo	1	33	4
Anticuerpos anti-centrómero	0	34	4

Tabla 8. Determinación de autoanticuerpos por ELISA en el momento de la entrevista.

	Positivo	Negativo	No realizado
Anticuerpos anti-U1-RNP	22	12	4
Anticuerpos anti-RNA	6	28	4
Anticuerpos anti-Sm	5	29	4
Anticuerpos anti-Ro	2	32	4
Anticuerpos antisintetasa	2	32	4
Anticuerpos anti-U5-RNP	1	33	4

Tabla 9. Determinación de autoanticuerpos por inmunoprecipitación en el momento de la entrevista.

Dados los diferentes resultados obtenidos en cuanto a la detección de autoanticuerpos, en función de la utilización de un método inmunológico u otro, se estudió la concordancia existente entre ambos métodos inmunológicos. Para ello se utilizó la correlación tetracórica, partiendo de los datos que a continuación expondré. De los 25 pacientes que presentaban por ELISA positividad para anti-U1-RNP (9 pacientes fue negativo), 22 presentaban positividad para dicho autoanticuerpo por la técnica de inmunoprecipitación (12 fue negativo). Aplicando el estudio de concordancia entre ambos métodos, obtuvimos una correlación de 0,606, con intervalo de confianza del 90% (0,257-0,954) para un valor de $p=0,0416$.

Entre los resultados analíticos estudiados destaca la presencia de hipergammaglobulinemia en 18 (47%) de los 38 pacientes estudiados, de predominio policlonal (17 pacientes). La velocidad de sedimentación globular (VSG) se halló elevada en 23 pacientes. El factor reumatoide (FR) fue positivo en 9 pacientes, considerándose dicha positividad por la presencia de títulos superiores a 1/40 de concentración. Un paciente fue positivo para el virus de la hepatitis C, y 2 presentaron una serología luética falsamente positiva, uno en la treponémica -TPHA- y otro en la reagínica -RPR-. Todos los pacientes presentaban negatividad para la serología del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La función tiroidea estaba alterada en 2 pacientes en forma de hipotiroidismo.

c.- ESTUDIO DEL SISTEMA DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Con respecto al estudio del sistema de histocompatibilidad (HLA) en pacientes con EMTC, para valorar la importancia de la predisposición genética se obtuvieron los resultados expuestos en la siguiente tabla.

(Puntualizaremos que en 7 pacientes no se pudo realizar el estudio, 3 por falta de muestra y 4 por éxitus)

Tipo HLA	Positivo	Negativo	No determinado
HLA-A 1	9	22	7
HLA-A 2	15	16	7
HLA-A 3	8	23	7
HLA-A 11	1	30	7
HLA-A 23	3	28	7
HLA-A 24	2	29	7
HLA-A 25	1	30	7
HLA-A 26	2	29	7
HLA-A 28	1	30	7
HLA-A 29	1	30	7
HLA-A 30	1	30	7
HLA-A 31	1	3	7
HLA-A 32	1	30	7
HLA-A 33	2	29	7
HLA-A 34	2	29	7
HLA-A 68	3	28	7

Tabla 10 (a). Determinación de HLA Clase I en pacientes con EMTC.

Tipo HLA	Positivo	Negativo	No determinado
HLA-B 7	9	22	7
HLA-B 8	6	25	7
HLA-B 14	3	28	7
HLA-B 18	3	28	7
HLA-B 27	2	29	7
HLA-B 35	2	29	7
HLA-B 37	1	30	7
HLA-B 38	2	29	7
HLA-B 44	6	25	7
HLA-B 49	4	27	7
HLA-B 50	1	30	7
HLA-B 51	4	27	7
HLA-B 53	2	29	7
HLA-B 55	2	29	7
HLA-B 57	2	29	7
HLA-B 60	3	28	7
HLA-B 62	2	29	7
HLA-B 63	1	30	7
HLA-B 70	1	30	7

Tabla 10 (b). Determinación de HLA Clase I en pacientes con EMTC.

Tipo HLA	Positivo	Negativo	No determinado
HLA-DR B1 1	9	22	7
HLA-DR B1 3	7	24	7
HLA-DR B1 4	11	20	7
HLA-DR B1 7	3	28	7
HLA-DR B1 8	3	28	7
HLA-DR B1 9	1	30	7
HLA-DR B1 10	1	30	7
HLA-DR B1 11	6	25	7
HLA-DR B1 13	5	26	7
HLA-DR B1 14	3	28	7
HLA-DR B1 15	8	23	7
HLA-DR B1 103	1	30	7
HLA-DR B3	1	30	7
HLA-DR B5	2	29	7
HLA-DQ B1 4	1	30	7
HLA-DQ B1 6	1	30	7

Tabla 11. Determinación de HLA clase II en pacientes con EMTC.

Con los resultados expuestos anteriormente, al estudiar la relación entre la presencia del HLA-DR1*04 con la enfermedad mixta del tejido conectivo no se hallaron diferencias significativas con respecto al grupo control; siendo el HLA-DR1*04 presente en el 35,4% de los pacientes y en el 13% en el grupo control. Tampoco se encontraron diferencias en el estudio de otros alelos entre pacientes con EMTC y el grupo control.

Con las mismas muestras de los 30 pacientes estudiados con EMTC, para el HLA, se pudo llevar a cabo el estudio de la frecuencia de diversos alelos del MICA en comparación con 30 pacientes del grupo control (de las 31 muestras séricas previas que disponíamos para el estudio del HLA, en 1 caso no pudo realizarse el estudio MICA por problemas de laboratorio, estudiándose por tanto 30 sueros). Los resultados quedan reflejados en la siguiente tabla.

	Pacientes	Controles
MICA 4	11 (36,7%)	9 (30,0%)
MICA 5	6 (10,0%)	6 (10,0%)
MICA 5.1	22 (73,3%)	19 (63,3%)
MICA 6	15 (50,0%)	18 (60,0%)
MICA 9	6 (20,0%)	8 (6,7%)

Tabla 12. Frecuencia de alelos MICA con respecto grupo control.

El análisis mediante la prueba de la Ji-cuadrado para valorar si dichos porcentajes eran estadísticamente significativos, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (valor de $p > 0,05$).

Asímismo se determinó la presencia de gen MICA en los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo comparado con 30 individuos pertenecientes al grupo control.

	Pacientes	Control
4/4	3 (10%)	1 (3,3%)
4/5	2 (6,7%)	0 (0,0%)
4/5.1	1 (3,3%)	3 (10%)
4/6	1 (3,3%)	3 (10%)
4/9	1 (3,3%)	1 (3,3%)
5/5	0 (0,0%)	1 (3,3%)
5/5.1	3 (10%)	3 (10%)
5/6	1 (3,3%)	1 (3,3%)
5/9	0 (0,0%)	0 (0,0%)
5.1/5.1	5 (16,7%)	3 (10%)
5.1/6	5 (16,7%)	3 (10%)
5.1/9	3 (10%)	3 (10%)
6/6	3 (10%)	4 (13,3%)
6/9	2 (6,7%)	2 (6,7%)
9/9	0 (0,0%)	1 (3,3%)

Tabla 13. Presencia del gen MICA en pacientes con EMTC respecto grupo control.

Se compararon los valores mostrados en la tabla anterior mediante el test exacto de Fisher en aquellos casos en los que la tabla de contingencia presentaba alguna celda con un valor inferior a 5 y mediante la Ji-cuadrado en el resto de casos. Realizando ambos análisis no se halló significación estadística en ningún caso ($p > 0,05$). Cabe destacar que en aquellos casos en los que un grupo no presenta ningún paciente con el alelo estudiado el programa estadístico no permite calcular la Ji-cuadrado, ya que no se considera una variable sino un valor constante. Dichos resultados pueden ser debidos al pequeño tamaño de la muestra.

El estudio de haplotipos característicos en pacientes con EMTC que habían sido demostrados en estudios previos, se compararon con el grupo control (n=30):

	Pacientes	Control
MICA4/DRB1*04	2 (6,7%)	0 (0,0%)
MICA5.1/DRB1*04	8 (26,7%)	4 (13,3%)
MICA4/not DRB1*04	6 (20%)	8 (26,7%)
MICA5.1/not DRB1*04	9 (30%)	11 (36,7%)

Tabla 14. Haplotipos en pacientes con EMTC con respecto grupo control.

En dicha valoración tampoco se halló significación estadística ($p>0,05$)

d.- CONTRACCIÓN DEL EPÍTOPO

La contracción del epítopo es un fenómeno descrito en los pacientes con EMTC. Se define como contracción del epítopo a aquella situación que se observa en determinados pacientes en los que habiéndose detectado positividad para el autoanticuerpo anti-U1-RNP, bien por el método de ELISA o bien por inmunoprecipitación, a lo largo del tiempo, se negativiza dicho valor, es decir desaparece el autoanticuerpo como consecuencia de un agotamiento de la respuesta inmune^{5,49}. Dicho fenómeno fue detectado en más de una cuarta parte (9 pacientes) de nuestro grupo de 34 pacientes (4 pacientes del grupo inicial eran éxitus). De éstos, 4 estaban asintomáticos, 2 presentaban síntomas leves, 2 pacientes síntomas moderados y un paciente sintomatología grave en forma de disnea. Un punto importante a remarcar, es que el diagnóstico inicial en todos los pacientes se realizó por ELISA. En la evolución del paciente se emplearon los 2 métodos básicos de ELISA, es decir la ELISA clásica y la ELISA sobre papel, obteniéndose como he expuesto previamente la negativización del valor en 9 pacientes.

No se apreció en dichos pacientes una mejor evolución clínica o remisión de la enfermedad estadísticamente significativa (prueba de Fisher $p=0,35$).

El no disponer de un estudio inicial por inmunoprecipitación no nos permitió valorar este fenómeno por dicha técnica, lo que sería interesante realizar en estudios posteriores, ya que por inmunoprecipitación se pueden llegar a detectar un número mayor de antígenos en comparación al ELISA, lo que podría explicar los distintos resultados obtenidos en una misma muestra⁴⁹.

	Etapa inicial enfermedad	Control posterior	Contracción del epítipo	Sintomatología
	ELISA Anti-U1-70 kd	IMMUNOBLOT 70kd, A,C		
1	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
2	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
3	Positivo	Negativo	Presente	Asintomático
4	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
5	Positivo	No realizado		
6	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma leve
7	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma moderado
8	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
9	Positivo	Negativo	Presente	Asintomático
10	Positivo	Negativo	Presente	Síntomas graves
11	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma leve
12	Positivo	Negativo	Presente	Síntoma moderado
13	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma leve
14	Positivo	No realizado		
15	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma moderado
16	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma leve
17	Positivo	Negativo	Presente	Síntoma moderado
18	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
19	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma moderado
20	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma leve
21	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma leve
22	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma leve
23	Positivo	No realizado		
24	Positivo	No realizado		
25	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
26	Positivo	Negativo	Presente	Síntoma leve
27	Positivo	Negativo	Presente	Asintomático
28	Positivo	Negativo	Presente	Síntoma leve
29	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
30	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma moderado
31	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
32	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
33	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
34	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
35	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
36	Positivo	Positivo	Ausente	Asintomático
37	Positivo	Negativo	Presente	Síntoma leve
38	Positivo	Positivo	Ausente	Síntoma leve

Tabla 15. Representación de la contracción del epítipo y la evolución clínica.

e.- ANÁLISIS DE VARIABLES

En este apartado, se estudió la existencia o no de asociación entre determinadas variables presentes en la EMTC. Así, lo que se hizo fue averiguar si existía una relación bivariada estadísticamente significativa (utilizando para ello la prueba la Ji-cuadrado), entre las siguientes variables:

- anti-U1-RNP e hipertensión arterial pulmonar
- anti-U1-RNP y patrón restrictivo (PFR)
- anti-U1-RNP y síndrome seco
- anti-Ro y síndrome seco
- anti-Ro y fotosensibilidad o aparición de exantema malar
- Fenómeno de Raynaud e hipertensión arterial pulmonar
- Fenómeno de Raynaud y anti-U1-RNP
- Alteración capilaroscopia y patrón restrictivo (PFR)
- Alteración capilaroscopia e hipertensión arterial pulmonar
- Afectación esofágica y patrón restrictivo (PFR)
- HLA-DR1 y artralgias
- HLA-DR3 y patrón restrictivo (PFR)
- HLA-DR3 y síndrome seco
- HLA-DR4 y artralgias
- HLA-DR4 y fenómeno de Raynaud
- HLA-DR4 y edema de manos
- HLA-DR4 y alteración capilaroscopia
- HLA-DR4 e hipertensión arterial pulmonar
- HLA-DR4 y patrón restrictivo (PFR)
- Factor reumatoide y patrón restrictivo (PFR)
- Factor reumatoide y artralgias

Tras realizar el estudio de asociación entre las variables, únicamente se halló asociación estadísticamente significativa entre anticuerpos anti-U1-RNP por IP y fenómeno de Raynaud ($p=0,002$).

El resto de asociaciones estudiadas no fueron significativas.

Dichos resultados nos indican que no hay evidencia estadísticamente significativa a favor de la relación entre estas variables, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula (no relación entre variables). Esto podría deberse a la baja n , que hace que las diferencias tengan que ser muy importantes para demostrar significación.

f.- CONCORDANCIA ENTRE LOS DIFERENTES

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Los pacientes fueron interrogados mediante un cuestionario exhaustivo, donde se recogían todos aquellos datos necesarios para valorar posteriormente el cumplimiento de los diferentes criterios de clasificación que definen a la EMTC, criterios de Alarcón-Segovia, criterios de Sharp y criterios de Kasuwaka.

Como se representa en el gráfico 10, de los 38 pacientes estudiados, 33 pacientes cumplieron los criterios de Alarcón-Segovia y 5 pacientes no los cumplieron. Los criterios de Kasuwaka eran cumplidos en 31 pacientes, no siendo así en 7 pacientes. Se detectaron 17 pacientes que cumplían los criterios de Sharp, no siendo así en 21 pacientes.

Se hallaron 15 pacientes que cumplían los 3 criterios de clasificación.

Cuando se estudiaba el cumplimiento de los criterios de Alarcón-Segovia y Kasuwaka, 11 pacientes los cumplían. Un paciente cumplía los criterios de Alarcón-Segovia y Sharp y un paciente los criterios de Kasuwaka y Sharp.

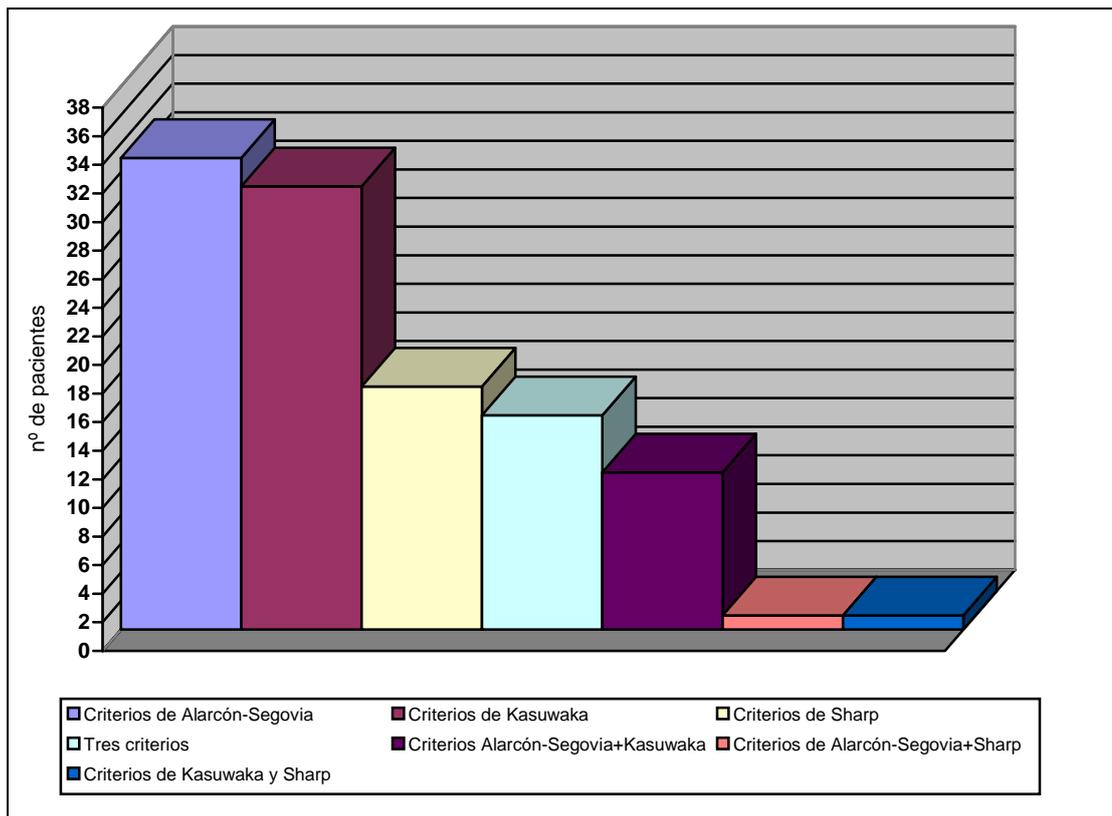


Gráfico 10. Cumplimiento de los criterios de clasificación de la EMTC.

Tras obtener los resultados expuestos anteriormente, se estudió la concordancia entre los diversos criterios diagnósticos, mediante la aplicación de la correlación tetracórica, con un intervalo de confianza del 90% y el valor de p , obteniendo una correlación entre Alarcón-Segovia y Kasuwaka de 0,11 con $p=0,74$, y el mismo valor de 0,55 con $p=0,06$ entre Alarcón-Segovia y Sharp y Kasuwaka y Sharp (por tanto no significativo).

Cuando estudiamos los acuerdos específicos entre los diversos criterios, hallamos que entre los de Alarcón-Segovia y Sharp y los de Kasuwaka y Sharp existía un acuerdo específico positivo (AEP) y un acuerdo específico negativo (AEN) coincidente de 0,67 y 0,43 respectivamente, no siendo estadísticamente significativo; obteniéndose entre los criterios de Alarcón-Segovia y Kasuwaka, significación estadística ($p=0,0035$) con un AEP de 0,8 y un AEN de 0, siendo el acuerdo total de 0,68 (es decir la suma de los individuos que concuerdan en negativo y positivo entre el total de casos). Destacar que el AEN entre ambos criterios es cero, es decir que no se ha hallado ningún caso de acuerdo negativo. Debido al pequeño tamaño de la muestra no se puede determinar en este caso, cual sería la proporción real de AEN, pudiendo afirmar que sería muy bajo.

En nuestro estudio, intentamos valorar la sensibilidad y especificidad de los criterios de clasificación existentes hasta el momento. Para ello, seguimos los pasos de un estudio realizado por Jean-Marc Amigues¹⁰⁸, donde partía de un grupo de pacientes con anti-U1-RNP a diferente título, pero a diferencia de nuestro estudio incluía aquellos casos con anticuerpos anti-Sm positivos.

Dado que no existía un grupo control, para valorar la sensibilidad y la especificidad de los criterios de clasificación se evaluó el cumplimiento de otras conectivopatías tales como el LES, esclerodermia y dermatopolimiositis y de los criterios de EMTC.

De igual forma en nuestro estudio 33 pacientes cumplían los criterios de Alarcón-Segovia, 31 pacientes cumplían Kasuwaka, 17 pacientes cumplían Sharp. Para cada una de estas tres series de criterios, se analizó la superposición con los diagnósticos de lupus, esclerodermia y miositis. Los resultados se muestran en la tabla 16. De los 27 pacientes que cumplen los criterios de lupus, esclerodermia, miopatía inflamatoria o superposición, 25 (92,6%) cumplen los criterios de Alarcón, 24 (88,9%) los criterios de Kasuwaka y 16 (52,2%) los criterios de Sharp.

	Total	Alarcón	Kasuwaka	Sharp
LES	10	8	8	4
Esclerodermia	4	4	4	3
Miopatía inflamatoria	1	1	1	1
Superposición	12	12	11	8

Tabla 16. Superposición de criterios de EMTC con otras conectivopatías.

Una vez realizado este análisis, se estudió la sensibilidad de dichos criterios de clasificación en nuestros pacientes. La especificidad no pudo ser estudiada ya que no existían verdaderos negativos, es decir, no había ningún paciente en nuestro grupo que no cumpliera ningún criterios de EMTC.

Así, como se indica en la tabla 17, se determinaron los falsos positivos (pacientes con positividad para los criterios de EMTC y positividad para los criterios de otras conectivopatías), falsos negativos (pacientes con negatividad para uno de los criterios de EMTC y positividad para al menos uno de los otros 2 criterios de EMTC), verdaderos positivos (pacientes con positividad a los criterios de EMTC y negatividad para los criterios de las otras conectivopatías) y verdaderos negativos (pacientes con negatividad a todos los criterios de EMTC).

Los resultados se muestran a continuación, observando que al no existir verdaderos negativos, no es posible el cálculo de la especificidad ni del valor predictivo negativo, obteniéndose una sensibilidad del 61,5% para los criterios de Alarcón-Segovia, un 50% para los de Kasuwaka y tan sólo un 8,3% para los de Sharp, resultado que dista mucho del obtenido en el estudio comentado, pudiéndose justificar por diferir las dos muestras en la inclusión de individuos con anti-Sm positivo.

Criterios	VP	FP	VN	FN	S	VPP
Alarcón-Segovia	8	25	0	5	61,5%	24,2%
Kasuwaka	7	24	0	7	50,0%	22,5%
Sharp	1	16	0	11	8,3%	5,8%

VP: verdadero positivo; FP: falso positivo; VN: verdadero negativo; FN: falso negativo; S: sensibilidad; VPP: valor predictivo positivo.

Tabla 17. Valoración de sensibilidad y VPP de los criterios de EMTC.

g.- ASOCIACIÓN ENTRE LA SINTOMATOLOGÍA Y EL CUMPLIMIENTO DE LOS CRITERIOS

En la tabla 18 se muestran los resultados para la distribución de los pacientes en función de los síntomas y una nueva variable, creada a partir del cumplimiento de los criterios de clasificación.

La variable cumplimiento se define con dos valores según si el individuo da positivo para un sólo grupo de criterios o para dos o más grupos, y nos permite valorar el nivel de asociación mediante tablas de contingencia y la prueba exacta de Fisher.

Como se puede observar, hallamos asociación estadísticamente significativa ($p=0,05$) entre la variable cumplimiento y las siguientes variables: esclerodactilia, fenómeno de Raynaud y debilidad muscular.

Además, en el límite de significación se hallaron las variables: edema de manos, esclerodermia, pruebas funcionales respiratorias alteradas -en forma de patrón restrictivo-, úlceras orales y elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG).

Estos niveles de asociación se pueden interpretar como el hecho, que dichas variables sirven para distinguir entre los dos grupos formados por la variable cumplimiento. Es decir, la presencia de alguna de estas variables, considerada de forma individual, está altamente relacionada con el hecho de clasificar como EMTC en dos o tres grupos de criterios.

Vemos, por ejemplo, que el cien por cien de los pacientes que presentan esclerodactilia cumplen dos o más grupos de criterios de clasificación, mientras que para los pacientes sin esclerodactilia, el nivel de cumplimiento en dos o tres criterios es sólo del 50%.

Variable (p valor)	Cumple 2 o más criterios		Cumple 1 criterio		Total
	n	(%)	n	(%)	
Edema de manos (p=0,087)					
Si	23	(79,3)	6	(20,7)	29
No	4	(44,4)	5	(55,6)	9
Esclerodactilia (p<0.001)					
Si	16	(100)	0	(0,0)	16
No	11	(50,0)	11	(50,0)	22
F. Raynaud (p=0,047)					
Si	25	(78,1)	7	(21,9)	32
No	2	(33,3)	4	(66,7)	6
Esclerodermia (p=0.076)					
Si	8	(100)	0	(0,0)	8
No	19	(63,3)	11	(36,7)	30
A. esofágica (p=0,298)					
Si	15	(78,9)	4	(21,1)	19
No	11	(68,7)	5	(31,3)	16
PFR (p=0,066)					
no restrictivo	3	(50,0)	3	(50,0)	6
restrictivo leve	13	(72,2)	5	(27,8)	18
restrictivo grave	10	(100)	0	(0,0)	10
Deb. Muscular (p=0,028)					
Si	19	(86,4)	3	(13,6)	22
No	8	(50,0)	8	(50,0)	16
Enz. Musculares (p=0,145)					
Si	13	(86,7)	2	(13,3)	15
No	14	(60,9)	9	(39,1)	23
A. cutánea (p=0,151)					
Si	15	(83,3)	3	(16,7)	18
No	11	(57,9)	8	(42,1)	19
Total	27	(71,0)	11	(29,0)	38

PFR: pruebas funcionales respiratorias

Tabla 18 (a). Distribución de pacientes según cumplimiento de criterios para síntomas estudiados. Prueba de Fisher.

Variable (p valor)	Cumple 2 o más criterios		Cumple 1 criterio		Total
	n	(%)	n	(%)	
Poliartritis (p=0,615)					
Si	24	(72,7)	9	(27,3)	33
No	3	(60,0)	2	(40,0)	5
Adenopatías (p=1,000)					
Si	4	(80,0)	1	(20,0)	5
no	23	(69,7)	10	(30,3)	33
HTAP (p=0,545)					
Si	7	(100)	0	(0,0)	7
no	16	(80,0)	4	(20,0)	20
Valvulopatía (p=0,615)					
Si	6	(75,0)	2	(25,0)	8
No	18	(81,8)	4	(18,2)	22
Miocardiopatía (p=0,394)					
Si	2	(66,7)	1	(33,3)	3
No	21	(87,5)	3	(12,5)	24
A. renal (p=0,615)					
Si	3	(60,0)	2	(40,0)	5
No	24	(72,7)	9	(27,3)	33
S. seco (p=0,476)					
Si	12	(63,2)	7	(36,8)	19
No	15	(78,9)	4	(21,1)	19
Exantema (p=1,000)					
Si	19	(70,4)	8	(29,6)	27
No	8	(72,7)	3	(27,3)	11
Fotosensibilidad (P=0,145)					
Si	13	(86,7)	2	(13,3)	15
No	14	(60,9)	9	(39,1)	23
U. orales (p=0,059)					
Si	12	(92,3)	1	(7,7)	13
No	15	(60,0)	10	(40,0)	25
Serositis (p=0,690)					
si	8	(80,0)	2	(20,0)	10
no	19	(67,9)	9	(32,1)	28
Anemia (p=1,000)					
si	9	(75,0)	3	(25,0)	12
no	18	(69,2)	8	(30,8)	26
Leucopenia (p=0,161)					
si	3	(42,9)	4	(57,1)	7
no	24	(77,4)	7	(22,6)	31
Plaquetopenia (p=1,000)					
si	4	(80,0)	1	(20,0)	5
no	23	(69,7)	10	(30,3)	33
VSG (p=0,073)					
si	19	(82,6)	4	(17,4)	23
no	8	(53,3)	7	(46,7)	15
Total	27	(71,0)	11	(29,0)	38

HTAP: hipertensión arterial pulmonar. VSG: velocidad de sedimentación globular.

Tabla 18 (b). Distribución de pacientes según cumplimiento de criterios para síntomas estudiados. Prueba de Fisher.

Tras valorar individualmente cada una de las variables según la variable cumplimiento, se revisaron todas ellas para determinar cuales debían ser incluidas en el estudio que se realizaría posteriormente, el análisis multivariante, donde además de tener en cuenta la significación estadística de éstas, también se tendría en cuenta el criterio clínico, ya que el hecho de tener una muestra tan pequeña podía dar lugar a rechazar o no presentar resultados estadísticos en variables con gran peso en la enfermedad.

A destacar, que tanto en la HTAP como en la afectación esofágica, no se halló significación estadística para la asociación con la variable cumplimiento, pero debido a su trascendencia clínica, fueron incluidas en los estudios de análisis multivariantes.

h.- PROPUESTA DE NUEVOS CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN

Uno de los principales objetivos de esta tesis, fue poder llegar a determinar unos criterios de clasificación únicos, y no tres grupos distintos de criterios de clasificación como sucede en la actualidad, donde se reflejaran aquellos aspectos de la enfermedad que con más frecuencia o especificidad están presentes en nuestra población problema.

Para ello, se partió de los resultados obtenidos en la tabla 18, para estudiar los patrones observados sobre las variables clínicas y estadísticamente relevantes (más el estudio mediante tablas de los criterios propuestos) a partir del análisis de correspondencias múltiples.

Para aplicar el análisis de correspondencias, identificamos cuales serian las variables ilustrativas y las variables activas. Para ello se decidió que las variables ilustrativas fueran los tres grupos de criterios diagnósticos conocidos hasta el momento, criterios de Sharp, criterios de Alarcón-Segovia y criterios de Kasuwaka, ya que aunque no nos interesara que participasen en la creación de los ejes (factores), si era interesante observar su proyección en el espacio factorial creado.

Como variables activas decidimos incluir aquellas que se habían presentado con mayor significación (ver tabla 18) en el análisis bivariante, por lo tanto las variables fueron esclerodactilia, fenómeno de Raynaud, debilidad muscular, edema de manos, esclerodermia, pruebas funcionales respiratorias alteradas, úlceras orales y elevación de la VSG.

A parte de estos criterios de inclusión más objetivos, también se añadieron como variables activas la HTAP y la afectación esofágica, dado el consenso existente entre los expertos sobre su significación clínica en relación a la enfermedad estudiada.

En la tabla 19, se muestran los resultados proporcionados por SPAD para el análisis que incluye las variables anteriormente especificadas.

Como se puede observar el primer factor aporta el 22% del total de la inercia explicada (es decir, del total de la información contenida en la solución proporcionada), mientras que la aportación del segundo factor es del 12%.

Número	Valor propio	Porcentaje	Porcentaje acumulado
1	0,3096	22,11	22,11
2	0,1654	11,82	33,93
3	0,1556	11,12	45,04
4	0,1295	9,25	54,29
5	0,1124	8,03	62,32
6	0,1022	7,30	69,62
7	0,0862	6,16	75,78
8	0,0790	5,65	81,42
9	0,0637	4,55	85,97
10	0,0561	4,01	89,98
11	0,0485	3,46	93,44
12	0,0411	2,93	96,37
13	0,0280	2,00	98,37
14	0,0228	1,63	100,00

Tabla 19. Análisis de las variables por SPAD.

A continuación mostramos la representación gráfica de lo explicado en la tabla previa:

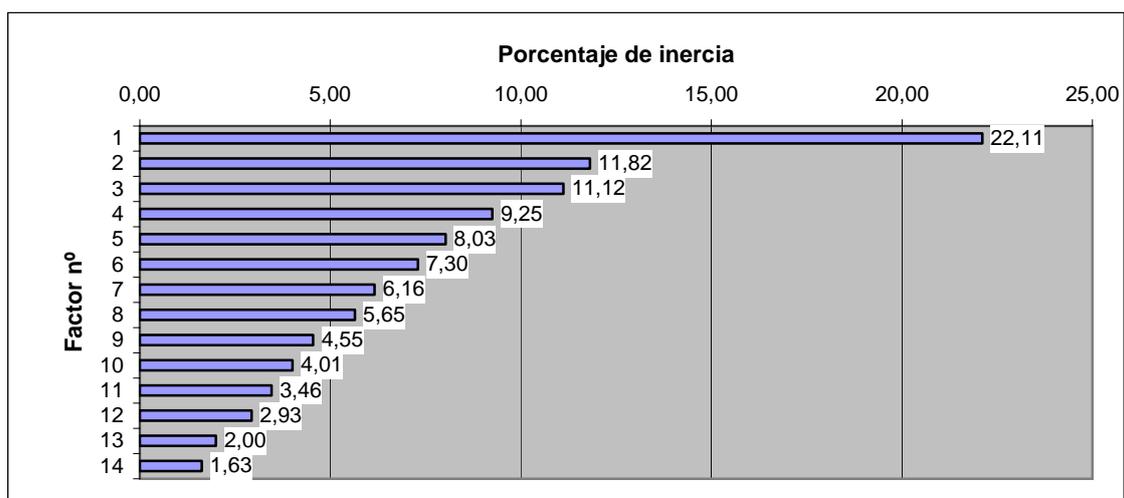


Gráfico 11. Representación gráfica del análisis de las variables por SPAD.

Evaluando las coordenadas de las distintas categorías, (tabla 20), para cada uno de los factores (ejes), se decidió retener para su interpretación, los dos primeros factores, que recogen en conjunto el 33% de la inercia total.

Modalidad	Peso relativo	Distancia al origen	Eje 1	Eje 2
Edema de manos				
no	2,368	3,22222	0,88	-1,11
si	7,632	0,31035	-0,27	0,34
Esclerodactilia				
no	5,789	0,72727	0,63	0,20
si	4,211	1,37500	-0,86	-0,27
Fenómeno de Raynaud				
no	1,579	5,33333	0,76	1,29
si	8,421	0,18750	-0,14	-0,24
Esclerodermia				
no	7,895	0,26667	0,36	0,16
si	2,105	3,75000	-1,36	-0,62
Afectación esofágica				
no	4,211	1,37500	0,21	-0,44
si	5,000	1,00000	-0,39	0,42
no consta	0,789	11,66670	1,35	-0,34
PFR				
no restrictiva	1,579	5,33333	0,06	0,44
restrictiva leve	4,737	1,11111	0,44	-0,20
restrictiva grave	2,632	2,80000	-1,18	-0,29
no consta	1,053	8,50000	0,89	0,95
Debilidad muscular				
no	4,211	1,37500	0,42	-0,53
si	5,789	0,72727	-0,31	0,39
HTAP				
no	5,263	0,90000	0,09	0,06
si	1,842	4,42857	-1,35	-0,45
Úlceras orales				
no	6,579	0,52000	0,36	-0,33
si	3,421	1,92308	-0,70	0,63
VSG				
normal	3,947	1,53333	0,35	-0,06
alta	6,053	0,65217	-0,23	0,04

PFR: pruebas funcionales respiratorias. HTAP: hipertensión arterial pulmonar. VSG: velocidad de sedimentación globular.

Tabla 20. Posición de las diversas variables respecto a los ejes.

La manera de interpretarlo fue la siguiente: el primer factor distingue entre las modalidades positivas y las negativas de las características incluidas en el análisis, por lo que se puede interpretar como un eje (o factor) que separa los casos patológicos (lado izquierdo) de los no patológicos (lado derecho), presentando máximas distancias para los casos graves (HTAP , PFR restrictiva grave), mientras que el segundo factor se interpreta en términos de tipología del paciente , ya que separa las modalidades que indican características más específicas de las distintas conectivopatías. En el extremo superior del gráfico se aprecian aquellas variables más características del lupus y miopatía, por lo que los pacientes afectados de EMTC que sólo presenten valores positivos para estas variables pueden mostrar una clara superposición con la patología lúpica y la miopatía inflamatoria (círculo rosa). En cambio, en el extremo de la mitad inferior las características halladas corresponden a pacientes con posible superposición con esclerodermia (círculo amarillo).

Así pues, interpretamos que las variables que se definen en el espacio intermedio (más cercano al segundo eje) son las que mejor definen la EMTC en nuestra muestra (círculo azul), dado que presentan menor superposición con otras conectivopatías.

Cabe notar que la delimitación de estos círculos es difusa puesto que no hay un sistema objetivo para establecer el punto de corte entre las diferentes zonas. Recordemos que la interpretación debe hacerse en términos de proximidad entre los puntos, puesto que la distancia representa el nivel de asociación entre las modalidades.

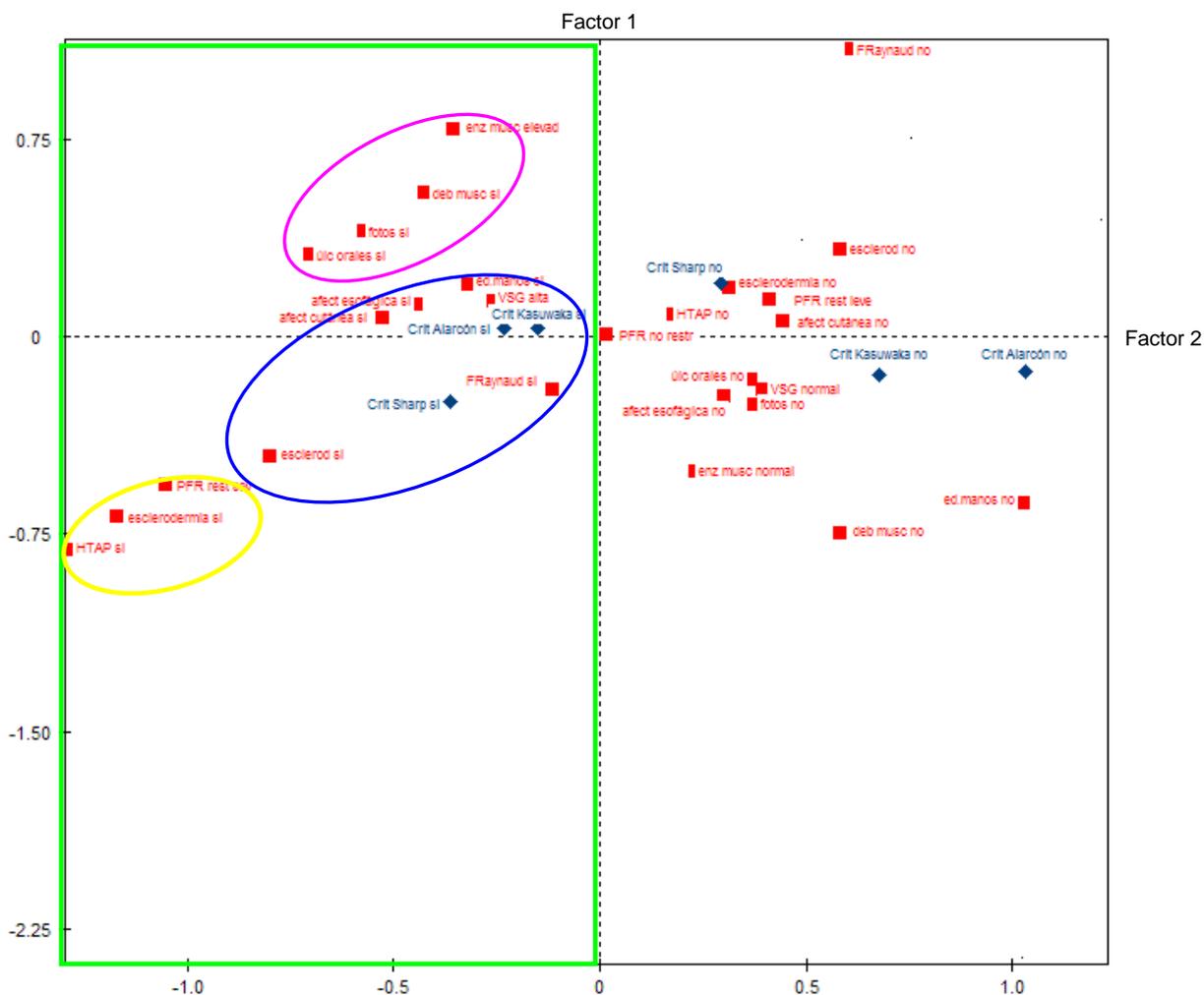


Figura 4. Representación del resultado de análisis multivariable: en rojo variables activas y en azul variables ilustrativas. El recuadro verde indica características patológicas. El área dentro del círculo azul representa los puntos con más proximidad a las manifestaciones de EMTC. El círculo amarillo recoge manifestaciones esclerodérmicas. El círculo rosa recoge manifestaciones lúpicas y de miopatía inflamatoria.

Como se puede observar, existe cierta proximidad entre las modalidades (categorías) positivas para los tres grupos de criterios diagnósticos y el grupo de modalidades edema de manos, VSG elevada, afectación esofágica, afectación cutánea, fenómeno de Raynaud y esclerodactilia, indicando grado de asociación entre dar positivo por alguno de los criterios existentes y la presencia de dichas características.

En consonancia a lo hallado en el estudio de concordancia los criterios de Kasuwaka y Alarcón-Segovia están más cercanos entre sí, indicando que los pacientes que dan positivo para estos criterios tienen perfiles parecidos. En cambio Sharp está más alejado en dirección a las variables que se relacionan con la esclerodermia confirmando lo encontrado en estudios anteriores¹⁰⁸ sobre su menor especificidad para la EMTC.

Si valoramos los resultados obtenidos en el análisis de correspondencias múltiple en comparación con los resultados del análisis bivariante del apartado **g.** (tabla 18) observamos que de las tres variables con mayor significación, sólo el fenómeno de Raynaud sigue presentando un papel central en el análisis multivariante (pues se halla en el centro de la zona definida por las modalidades positivas de los tres criterios diagnósticos, en adelante llamada zona EMTC). Aún así, tanto las variables esclerodactilia como debilidad muscular están próximas a la zona EMTC. Las variables edema de manos y VSG alta que en el análisis bivariante estaban en el límite de la significación estadística ($p=0,05$) siguen estando dentro de la zona EMTC, así como las variables afectación cutánea, incluida con un valor de p menos restrictivo, y afectación esofágica, que se incluyó bajo criterios clínicos puesto que no presentaba significación estadística.

El resto de variables que resultaron estadísticamente significativas en el estudio bivariante se alejan un poco más de la zona EMTC. En ninguno de los dos análisis se corroboró estadísticamente la trascendencia clínica de la HTAP, quizás debido a que se pudo realizar dicha prueba en todos los pacientes. En muestras de tamaño reducido como es el caso siempre hay que tener en cuenta que se maximiza el efecto de los datos ausentes camuflando posibles efectos de las variables estudiadas.

Tras dichas observaciones finalmente pasamos a considerar como variables que caracterizan mejor la EMTC: fenómeno de Raynaud y esclerodactilia puesto que en ambos análisis son muy representativas; edema de manos por su peso en el análisis multivariante siendo en el análisis bivariante una de las variables en el límite de significación; afectación esofágica que también presenta un papel importante en el análisis multivariante y que viene respaldada por su relevancia clínica; así como las PFR alteradas en forma de patrón restrictivo, que estando en el límite de significación en el análisis bivariante y algo más alejadas en el análisis multivariante son de gran trascendencia clínica para la especificidad de la EMTC.

Dejamos fuera de estos criterios debilidad muscular y la VSG alta por su poca especificidad a pesar de presentar buenos resultados en ambos análisis. Finalmente no ha sido posible incluir la HTAP debido a los malos resultados presentados en ambos análisis aunque dada su relevancia clínica (principalmente porque marca el pronóstico) no se descarta que en próximos estudios con muestras de mayor peso pueda ser incluida.

Así, los criterios diagnósticos que proponemos son los siguientes:

A.- Criterio serológico:

Anti-U1-RNP por inmunoprecipitación,

B.- Criterio clínico:

Fenómeno de Raynaud

Esclerodactilia

Edema de manos

Afectación esofágica

Patrón restrictivo o disminución del DLCO

Pero, tras haber determinado las variables que componen nuestros criterios diagnósticos, nos planteamos el valorar cuántas de estas variables, siempre partiendo de la base de la obligatoriedad del anti-U1-RNP, son necesarias considerar en la práctica clínica, para realmente estar seguros que estamos abarcando la mayor parte de pacientes, sin cometer el error, de considerar a individuos sanos como enfermos, o dejar de diagnosticar a enfermos por querer ser muy restrictivos.

Para ello se realizó la siguiente tabla (ver tabla 21), donde como podemos observar se representan las diferentes variables que forman nuestros criterios de clasificación así como la variable creada a partir del cumplimiento de los criterios de clasificación.

Manifestaciones que conforman los criterios de clasificación de la EMTC					3 ó 2 criterios		1 criterio		total
Esclerodactilia	Raynaud	Edema manos	Afect. esofágica	PFR	n	%	n	%	
si	si	si	si	NR	2	(100,0)	0	(0,0)	2
no	si	si	si	NR	1	(100,0)	0	(0,0)	1
si	no	si	si	NR	-	-	-	-	-
si	si	no	si	NR	-	-	-	-	-
si	si	si	no	NR	-	-	-	-	-
si	si	no	no	NR	-	-	-	-	-
si	no	no	si	NR	-	-	-	-	-
no	no	si	si	NR	-	-	-	-	-
si	no	si	no	NR	-	-	-	-	-
no	si	no	si	NR	-	-	-	-	-
no	si	si	no	NR	0	(0,0)	2	(100,0)	2
si	no	no	no	NR	-	-	-	-	-
no	si	no	no	NR	-	-	-	-	-
no	no	si	no	NR	-	-	-	-	-
no	no	no	si	NR	0	(0,0)	1	(100,0)	1
no	no	no	no	NR	-	-	-	-	-
si	si	si	si	ML	5	(100,0)	0	(0,0)	5
no	si	si	Si	ML	4	(80,0)	1	(20,0)	5
si	no	si	Si	ML	-	-	-	-	-
si	si	no	Si	ML	-	-	-	-	-
si	si	si	No	ML	5	(100,0)	0	(0,0)	5
si	si	no	No	ML	-	-	-	-	-
si	no	no	Si	ML	-	-	-	-	-
no	no	si	Si	ML	-	-	-	-	-
si	no	si	No	ML	-	-	-	-	-
no	si	no	Si	ML	-	-	-	-	-
no	si	si	No	ML	2	(40,0)	3	(60,0)	5
si	no	no	No	ML	-	-	-	-	-
no	si	no	No	ML	-	-	-	-	-
no	no	si	No	ML	-	-	-	-	-
no	no	no	Si	ML	0	(0,0)	1	(100,0)	1
no	no	no	No	ML	1	(100,0)	0	(0,0)	1
si	si	si	Si	G	3	(100,0)	0	(0,0)	3
no	si	si	Si	G	-	-	-	-	-
si	no	si	Si	G	-	-	-	-	-
si	si	no	Si	G	-	-	-	-	-
si	si	si	No	G	-	-	-	-	-
si	si	no	No	G	-	-	-	-	-
si	no	no	Si	G	-	-	-	-	-
no	no	si	Si	G	-	-	-	-	-
si	no	si	No	G	-	-	-	-	-
no	si	no	Si	G	-	-	-	-	-
no	si	si	No	G	1	(100,0)	0	(0,0)	1
si	no	no	No	G	-	-	-	-	-
no	si	no	No	G	-	-	-	-	-
no	no	si	No	G	-	-	-	-	-
no	no	no	Si	G	-	-	-	-	-
no	no	no	No	G	-	-	-	-	-

PFR: pruebas funcionales respiratorias; NR: no realizado; ML: moderado-leve; G: grave.

Tabla 21. Propuesta de las variables necesarias para determinar los nuevos criterio diagnósticos propuestos.

Como podemos observar, se calcularon las posibles combinaciones existentes entre las variables, valorando para cada combinación el número de pacientes que daban positivo para la categoría cumplimiento o no cumplimiento.

Posteriormente se proponían diferentes posibilidades para los criterios diagnósticos, es decir el cumplir el criterio inmunológico y al menos una , 2, 3 o 4 variables, valorando para cada supuesto, qué porcentaje de pacientes serían clasificados en la categoría cumplimiento, dando a entender, que dicha propuesta identificaría mejor al grupo de enfermos. Así a continuación expondré los resultados para cada propuesta:

1.- *Anti-U1-RNP (+), más al menos 1 variable: 75%* (es decir, en aquellos pacientes que cumplan el criterio inmunológico y al menos una de las variables propuestas, el 75% de éstos darían positivo a 2 ó más criterios de clasificación previos, mientras que el 25% restante únicamente daría positivo para un criterio).

2.- *Anti-U1-RNP (+), más al menos 2 variables: 76%.*

3.- *Anti-U1-RNP (+), más al menos 3 variables: 85%.*

4.- *Anti-U1-RNP (+), más al menos 4 variables: 95%.*

5.- *Anti-U1-RNP (+), más las 5 variables: 100%.*

Otra posibilidad propuesta fue, si se daba el criterio inmunológico y presentaba alteración en las pruebas respiratorias, cuántas de las 4 variables restantes eran necesarias para catalogar correctamente a los enfermos; los resultados fueron los siguientes:

1.- *Anti-U1-RNP (+) y PFR restrictiva, más al menos 1 variable: 80%.*

2.- *Anti-U1-RNP (+) y PFR restrictiva, más al menos 2 variables: 83%.*

3.- *Anti-U1-RNP (+) y PFR restrictiva, más al menos 3 variables: 94%.*

4.- *Anti-U1-RNP (+) y PFR restrictiva, más las 4 variables: 100%.*

Tras obtener dichos resultados estadísticos, ahora la importancia radicará en la valoración a nivel de la práctica clínica, ya que a pesar que lo que más nos gustaría es obtener unos criterios cuya especificidad fuera cercana al 100% seguramente nos dejaríamos un número considerable de pacientes sin diagnosticar, por lo que quizás, vale más la pena valorar aquellas opciones de más fácil cumplimiento.

DISCUSIÓN

a.- EMTC COMO ENTIDAD INDEPENDIENTE Y SU RELACIÓN CON OTRAS CONECTIVOPATÍAS

Desde que en 1972 Sharp et al³ definieran una nueva entidad, catalogada como enfermedad mixta del tejido conectivo, se inició un debate que todavía no se ha resuelto⁴ respecto a si en realidad se trataba de una entidad clínico-inmunológica independiente, una mezcla de otras enfermedades sistémicas o una estación intermedia entre una conectivopatía indiferenciada y una enfermedad sistémica bien definida.

Algunos autores^{8,109} defienden la utilidad del concepto de EMTC, y basan su discurso en la presencia de unas manifestaciones clínicas características –rasgos clínicos de lupus, miositis, esclerodermia y artritis reumatoide-, la existencia de un marcador serológico específico –positividad para los anticuerpos anti-U1-RNP-, así como un sustrato genético propio que permiten su definición como una enfermedad distinta. Contrariamente, otros^{6,13,40,110} niegan su existencia argumentando que en realidad no es la enfermedad benigna que inicialmente describió Sharp; que el diagnóstico no se mantiene a lo largo del tiempo, ya que muchos de los enfermos diagnosticados de EMTC acabaron por cumplir criterios diagnósticos de otras enfermedades sistémicas como el lupus o la esclerodermia; o que existen demasiados criterios diagnósticos y ninguno de ellos aceptado de forma indiscutible.

El estudio histórico de los pacientes presentados en esta Tesis Doctoral nos permite aportar algo más de luz a la ya citada controversia de si se trata o no de una enfermedad independiente. Analizaremos punto por punto aquellos aspectos que consideramos más ilustrativos comparándolos con los estudios publicados en la bibliografía médica.

Una de las principales críticas que ha recibido la EMTC es que en su descripción inicial³ se consideró una enfermedad benigna, mientras que el seguimiento de la cohorte original^{13,49} demostró que hasta un 15% de los mismos mantenían actividad de la enfermedad y una cuarta parte habían fallecido, siendo la principal causa de muerte la HTAP. El seguimiento medio de estos pacientes fue de 15 años. En este sentido los resultados de nuestro estudio, con un seguimiento medio de 5,5 años, aportan lo siguiente: en primer lugar llama la atención que la mortalidad es algo inferior, del 10%, y si nos ceñimos a la mortalidad por la enfermedad propiamente dicha, aún menor, del 2,6%. El hecho que el cáncer sea la principal causa de mortalidad probablemente es de naturaleza aleatoria, ya que ni el comportamiento en nuestros pacientes fue paraneoplásico ni está descrita esta complicación en la EMTC, si bien en algún caso publicado se asocia la presencia de anticuerpos anti-U1-RNP a cáncer⁷³. Es difícil establecer cual es la mortalidad atribuible a la enfermedad ya que no existen estudios comparativos con grupo control en la población, si bien la media de las diferentes series publicadas es del 13%, no muy diferente de la obtenida por nosotros¹¹¹.

Aunque la HTAP es la principal causa de muerte en las series mejor estudiadas⁴⁹ no fue así en nuestro estudio. Si bien se diagnosticaron 7 pacientes (18%) con esta complicación durante el curso clínico de la enfermedad, porcentaje similar al obtenido en otras series^{49,112}, no se produjo el fallecimiento hasta la fecha de ninguno de estos pacientes. Ello podría deberse a la implementación de nuevas terapias para el tratamiento de la HTAP como los antagonistas de la endotelina-1 (bosentán) y los inhibidores de la fosfodiesterasa que complementan el tratamiento convencional con anticoagulantes y análogos de la prostaciclina¹¹³. Así mismo, cabe reseñar que en el caso que evolucionó más desfavorablemente, el trasplante pulmonar solventó el problema, de momento con éxito. No podemos sin embargo asegurar, dado el escaso número de la muestra de pacientes estudiados que los próximos pacientes con HTAP tengan la misma buena evolución.

Otra de las críticas que se ha hecho a la EMTC es que no mantiene el diagnóstico durante el tiempo, es decir que lo que era una EMTC acaba siendo otra enfermedad sistémica con el paso del tiempo. En la tabla 2 se recogen los principales estudios, algunos de los cuales detectan hasta un 40-45% de pacientes que cambian de diagnóstico a los pocos años de seguimiento. Sin embargo no todos los autores obtienen estos resultados. En este sentido nuestro estudio poco puede aportar ya que la mayoría de enfermos incluidos, lo son a partir de la presencia de anticuerpos anti-RNP por técnica de ELISA clásica (complejo snRNP), muchos de ellos no diagnosticados de EMTC; por el contrario y precisamente gracias a su peculiar diseño, lo que si que podemos afirmar, es que la presencia de anticuerpos anti-RNP es un buen predictor de desarrollo ulterior de una EMTC, ya que el 74% de los pacientes con anti-RNP

evolucionaron a una EMTC definida por alguno de los tres criterios diagnósticos. Un 42% de los pacientes de nuestra serie fueron diagnosticados inicialmente de otra conectivopatía, mientras que en el momento de la reciente visita por motivo del actual estudio todos ellos cumplían al menos uno de los 3 grupos de criterios diagnósticos de EMTC.

Otros autores han obtenido resultados similares a los expuestos, así Lundberg et al⁴¹, en un estudio prospectivo sobre 32 pacientes con anticuerpos anti-RNP encontraron que a los 5 años de seguimiento un 73% de los pacientes con títulos elevados de anti-RNP cumplían criterios de EMTC, en este caso los de Alarcón-Segovia. Creemos que éste es un aspecto relevante de nuestro estudio, ya que atribuye un protagonismo diagnóstico a los anti-U1-RNP y apoya los nuevos criterios diagnósticos propuestos que se comentarán al final de esta discusión.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad mixta incluyen signos y síntomas compartidos por la artritis reumatoide, la esclerodermia, el lupus y la polimiositis o dermatomiositis^{114,115}. Es por tanto de interés analizar las similitudes y/o diferencias entre la EMTC y cada una de estas enfermedades sistémicas autoinmunes.

Así, la artritis reumatoide cursa con afectación simétrica de las articulaciones, de predominio en manos, erosiva, con rigidez matutina, que afecta con menor frecuencia que otras conectivopatías los órganos internos y que cursa con factor reumatoide (FR) positivo en la mayoría de los casos. Los pacientes con EMTC presentan un FR positivo en un 50-70%, si bien y como hecho diferencial la artritis que presentan en la mayoría de las ocasiones no es una artritis erosiva.

El análisis de nuestros pacientes puso de manifiesto que la afectación articular inflamatoria en forma de poliartritis era una de las manifestaciones más frecuentes de la enfermedad no sólo como forma de inicio sino también durante el curso de la misma (33 casos; 86%), pudimos demostrar que raramente causaban deformaciones articulares, aunque si que habían sido objetivadas por radiografía erosiones en algunos casos. Aunque el FR fue positivo en 9 (23%) pacientes a título bajo, ante la presencia de anticuerpos anti-RNP positivos, la poliartritis con FR positivo no representó un problema diagnóstico. La reciente descripción de los anticuerpos anti-péptido citrulinado como marcadores diagnósticos de pacientes con artritis reumatoide facilita aún más la diferenciación entre ambas entidades.

En el estudio realizado por Sharp GC et al³ los pacientes con EMTC se distinguían de aquellos que presentaban esclerosis sistémica progresiva, en que los primeros tenían manifestaciones de lupus y de polimiositis y respondían bien al tratamiento con glucocorticoides, hallando en el suero anti-RNP, en general, a títulos elevados. En la esclerodermia, la presencia de artritis y miositis se presenta de una forma menos frecuente e intensa que en la EMTC y la presencia de autoanticuerpos específicos como el anti-Scl70 o anti-topoisomerasa en la forma difusa o los anticuerpos anti-centrómero en la forma limitada, o los anticuerpos anti-PM/Scl en las formas de escleromiositis permiten distinguir con facilidad ambas entidades.

La afectación esofágica, el fenómeno de Raynaud, la esclerodactilia, así como la presencia de hipertensión pulmonar o afectación pulmonar intersticial son características clínicas compartidas por ambas enfermedades, de ahí la importancia del estudio inmunológico que permitirá su discriminación.

En este sentido es interesante señalar que sólo en un paciente de los 38 estudiados se detectó la presencia de anti-Scl70, y en ningún caso de anticuerpos anticentrómero. Únicamente 5 de nuestros pacientes estaban diagnosticados de esclerodermia, presentando en el momento del diagnóstico criterios de EMTC.

La baja frecuencia de afectación renal, la especificidad de los anticuerpos anti-ENA, la ausencia de anti-Sm, la infrecuente positividad de los anticuerpos anti-DNA y los valores normales o elevados de complemento en suero, distinguen los pacientes de EMTC de los afectados de lupus. El lupus eritematoso sistémico, cursa con frecuencia con fenómeno de Raynaud, siendo rara la presencia de edema de manos o de esclerodactilia, manifestaciones que como ya se ha comentado, son características de la EMTC. Con respecto a la afectación articular no suele producir erosiones, siendo menos frecuente la presencia de factor reumatoide. Así mismo, la afectación muscular, la afectación pulmonar intersticial y la afectación esofágica son poco prevalentes; siendo importante tanto en el pronóstico como en la frecuencia la afectación renal, en relación con los anticuerpos anti-DNA. Con respecto a los marcadores inmunológicos es muy característico en los pacientes con lupus, la presencia del anticuerpo anti-Sm, anticuerpo antinuclear sensible a la acción de la enzima ribonucleasa, lo que sugiere especificidad antigénica frente a una ribonucleoproteína nuclear (RNP).

Algunos de los pacientes de nuestro estudio, fueron catalogados de lupus dado que cumplían muchas de las características de dicha enfermedad, pero la presencia de títulos elevados de anti-U1-RNP junto con la negatividad del anticuerpo anti-Sm y de los anti-DNA, favorece el diagnóstico de EMTC y no de lupus. A tener en cuenta que el error de catalogar a los pacientes con EMTC como afectados de lupus también está causado, en parte, por la disparidad de los criterios diagnósticos, ya que tan sólo los criterios de Sharp consideran la exclusión del diagnóstico de EMTC cuando éste se asocia a anticuerpos anti-Sm, mientras que los criterios de Kasuwaka y Alarcón-Segovia no descartan el diagnóstico de EMTC a pesar que el anti-Sm sea positivo. En cualquier caso los anticuerpos anti-Sm y anti-DNA (a títulos bajos) fueron positivos solamente en un bajo porcentaje de nuestros pacientes (ver tablas 8 y 9).

El hallazgo en sueros humanos de anticuerpos dirigidos contra la proteína U1-C junto a los anticuerpos anti-U1-RNP, parece impedir la respuesta inmune frente a la partícula U1-C-Sm y por tanto les confiere un papel estabilizador, justificando la no expresión en los pacientes con EMTC de dichos autoanticuerpos¹¹⁶. De los 38 pacientes estudiados, sólo 8 de ellos estaban diagnosticados de lupus, presentando en el momento del interrogatorio criterios de EMTC.

La polimiositis o dermatomiositis, pueden debutar con manifestaciones extramusculares tales como fenómeno de Raynaud, artritis o enfermedad pulmonar. La artritis suele ser no erosiva. Cuando se produce la afectación muscular, suele ser una miositis grave e invalidante, y es lo que define clínicamente la enfermedad. Con respecto a la afectación esofágica no suele afectarse el 1/3 inferior del esófago (zona característicamente afectada en la EMTC), sino que la afectación esofágica corresponde a la debilidad de la musculatura cricofaríngea, responsable del inicio de la deglución, lo que ayuda al diagnóstico diferencial de ambas entidades¹¹⁷. La positividad para anticuerpos específicos de miositis como los anti-sintetasa, de los que el anti-Jo-1 es el más conocido, aunque poco frecuentes ayudan a la discriminación entre ambas entidades¹¹⁸. Únicamente en un caso los anticuerpos anti-Jo-1 fueron positivos.

Con todo lo expuesto anteriormente, podríamos concluir, que en los pacientes afectados de conectivopatías los síntomas y manifestaciones clínicas que involucran a diversos órganos, pueden coincidir en mayor o menor frecuencia, con mayor o menor intensidad, y dichas características tendrán que ser respaldadas principalmente por una base genética característica y unos marcadores inmunológicos específicos de la enfermedad. En el caso de la EMTC, es nuestra opinión, que la presencia de anticuerpos anti-U1-RNP es fundamental para el diagnóstico. Sin embargo siguen existiendo dificultades y/o discrepancias diagnósticas en los pacientes con EMTC con respecto a otras conectivopatías, que en general presentan unos criterios diagnósticos únicos y una clara definición clínico-inmunológica.

Creemos por tanto que son necesarios unos criterios diagnósticos o de clasificación que ayuden a seleccionar correctamente a los pacientes con síntomas y características inmunológicas de la enfermedad.

Por último uno de los puntos que se ha esgrimido con mayor frecuencia ha sido la proliferación de criterios diagnósticos, al menos 3 distintos, que hemos recogido en el estudio de los pacientes con EMTC: los de Sharp, de Alarcón-Segovia y de Kasukawa. Es bien sabido que la existencia de varios criterios diagnósticos no es más que la expresión de la dificultad a la hora de catalogar estos pacientes, por lo que si se quiere realmente establecer la EMTC como entidad independiente respecto a otras conectivopatías deberían unificarse los criterios diagnósticos tal como sucede por ejemplo en el lupus o en la esclerodermia. Sin embargo debemos recordar que los llamados “criterios diagnósticos” son en realidad “de clasificación” en un intento de agrupar a pacientes con manifestaciones clínicas similares, con el objetivo de establecer un pronóstico y tratamiento adecuado, y en este contexto y no en otro, hay que interpretarlos. Uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido establecer el nivel de concordancia entre los 3 distintos grupos de criterios mencionados y en función de los resultados clínicos, serológicos y genéticos obtenidos en la serie de pacientes estudiados, definir de la forma más estricta unos nuevos criterios diagnósticos. Dada la importancia de este punto, se tratará de forma independiente más adelante.

b.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y HALLAZGOS

INMUNOLÓGICOS EN LA EMTC

La EMTC es una enfermedad del tejido conectivo que se caracteriza por presentar rasgos clínicos de enfermedad lúpica, esclerodermia y polimiositis/dermatomiositis, junto un marcador inmunológico característico, el anti U1-RNP, y una base genética caracterizada por una mayor frecuencia del HLA-DR4³. Sin embargo, el análisis de las manifestaciones clínicas de esta entidad está en parte condicionado a los criterios diagnósticos utilizados en los diferentes estudios publicados.

Swanton J et al ¹¹⁹ analizan las manifestaciones clínicas de la EMTC en relación al momento de su aparición. Así distinguen las que aparecen al inicio de la enfermedad, las que denomina acumulativas, es decir que persisten a pesar del tratamiento inicial y se van sumando con el paso del tiempo y finalmente las que aparecen tras un seguimiento de varios años.

Estos autores observan que el fenómeno de Raynaud es la manifestación inicial más frecuente (74%), junto a las poliartralgias y el edema de manos (45%). Los resultados de nuestro estudio coinciden con los datos de Swanton; el fenómeno de Raynaud fue la principal manifestación al inicio de la enfermedad (29%), en segundo lugar las artralgias-artritis (26%) y en tercer lugar la disnea (16%), siendo ésta con frecuencia infradiagnosticada al inicio de la enfermedad, por presentarse de forma muy larvada y en algunas ocasiones con clínica inespecífica, refiriéndola los pacientes como astenia, fatiga, depresión.

Al revisar estudios realizados por diversos autores^{13,17,19} sobre la clínica de debut de la enfermedad, no encontramos ninguno que recoja como síntoma inicial la disnea. Dado que la afectación pulmonar en forma de neumonitis intersticial o HTAP es una manifestación de la EMTC, pensamos que este hallazgo es relevante y obliga a un cribado espirométrico que incluya la CVF y la DLCO en el inicio del diagnóstico de la enfermedad. Más adelante volveremos sobre este punto al hablar de las manifestaciones pulmonares en pacientes con EMTC.

En cuanto al fenómeno de Raynaud, creemos que tiene un protagonismo diagnóstico en los pacientes con EMTC. En la fase de estado o acumulativa de la enfermedad y en el seguimiento a los 5 años, tanto en nuestra serie como en la bibliografía médica (recogida por Swanton¹¹⁹) sigue siendo el más frecuente de los signos clínicos, y aunque su patogénesis no parece ser demasiado distinta de los pacientes con esclerodermia, su presencia junto a anticuerpos anti-U1-RNP sugiere el diagnóstico de EMTC, tal y como ha sido recogido por algunos autores¹²⁰, y como se deriva del estudio aquí presentado (ver nuevos criterios). Si bien el fenómeno de Raynaud está incluido en los 3 grupos de criterios diagnósticos (Sharp, Alarcón-Segovia, Kasukawa), en los nuevos criterios de EMTC que proponemos y que trataremos más adelante, la presencia anti-U1-RNP determinados por IP junto al fenómeno de Raynaud nos aproximan al diagnóstico de la enfermedad. Aún más, parece existir una íntima relación entre los anticuerpos anti-U1-RNP y el fenómeno de Raynaud, sospechándose un papel etiopatogénico de estos autoanticuerpos. En series de pacientes con UCTD^{18,121}, se encuentra una relación significativa entre el fenómeno de Raynaud y los anti-U1-RNP.

En nuestro estudio, la única asociación estadísticamente significativa que se encontró al analizar diferentes variables fue precisamente la asociación entre los anticuerpos anti-U1 RNP y el fenómeno de Raynaud.

Una de las manifestaciones más frecuentes de los pacientes con EMTC es la afectación articular de la que ya hemos hablado en relación al diagnóstico diferencial con la artritis reumatoide.

Además de las manifestaciones clínicas que se observan con más frecuencia en los pacientes afectados de EMTC, existen otras menos frecuentes, pero en ocasiones muy específicas que pueden estar presentes y en ocasiones orientarnos hacia una enfermedad sistémica e incluso marcarnos el pronóstico de la enfermedad, como sería el caso de la presencia de vasculitis livedoide asociada a un peor pronóstico de la enfermedad⁶⁴. Así, hallamos en nuestro grupo, pacientes con las siguientes manifestaciones cutáneas: fotosensibilidad, exantema cutáneo, úlceras, alopecia y calcinosis, también recogidas en otros estudios¹²². No encontramos relación estadísticamente significativa entre la presencia de anticuerpos anti-Ro y lesiones cutáneas en forma de exantema o fotosensibilidad. En nuestro trabajo, las manifestaciones menos frecuentes fueron, la presencia de fotosensibilidad, exantema malar, serositis, (manifestaciones típicas del lupus), úlceras cutáneas, vasculitis asociadas y neuralgia del trigémino.

La afectación cardíaca es con frecuencia infradiagnosticada^{56,57}. Un ejemplo de ello es la pericarditis, que en muchos casos puede pasar desapercibida, debido a la clínica con frecuencia larvada e inespecífica. Otras alteraciones cardíacas que podemos hallar en relación con la EMTC son las valvulopatías, la inflamación del miocardio o las alteraciones en la conducción cardíaca. La afectación valvular es poco frecuente y en general con poca repercusión clínica. En los pacientes de esta serie las alteraciones valvulares encontradas incluyeron insuficiencia mitral, insuficiencia aórtica, insuficiencia tricuspídea, estenosis mitral, estenosis aórtica y en un paciente una mitral mixoide, sin llegar a representar en ningún momento un problema diagnóstico o terapéutico. A destacar que el único caso de éxitus atribuido a la EMTC en nuestra serie, fue debido a trastornos de la conducción cardíaca presentando una arritmia fatal en el contexto de una insuficiencia cardíaca refractaria al tratamiento. En dos casos más, se detectó afectación miocárdica, una mujer con una miocardiopatía dilatada probablemente por miocarditis, al descartarse otros factores etiológicos más comunes como el alcohol, la amiloidosis, la isquemia o la hipertensión arterial en fase avanzada; y otro paciente con una miocardiopatía hipertrófica obstructiva. Aún siendo difícil atribuir un papel causal en este caso a la EMTC, esta entidad se ha descrito acompañando a otras enfermedades autoinmunes sistémicas como la dermatomiositis o el lupus, sin que pueda descartarse un nexo genético común todavía hoy no bien conocido¹²³.

La afectación pulmonar, bien en forma de hipertensión arterial pulmonar, o bien en forma de afectación intersticial pulmonar es una manifestación relevante que marca el pronóstico y la morbilidad de la EMTC.

En relación a la HTAP ya se han comentado los resultados de nuestro estudio anteriormente en relación a la benignidad o no de la EMTC. Cuando la afectación es de predominio intersticial, se observa un patrón restrictivo o descenso de la DLCO como primera manifestación de la alteración del funcionalismo pulmonar, e imágenes en vidrio esmerilado o fibrosis pulmonar por radiografía de tórax y/o TC torácica. La manifestación clínica suele ser en forma de tos seca y/o disnea. La neumonitis intersticial que acompaña a la EMTC se considera una manifestación importante de la enfermedad, que por tanto marcará el pronóstico y la morbilidad de estos pacientes. En nuestro estudio las pruebas funcionales respiratorias fueron realizadas a la mayoría de los pacientes (34; 89%), apreciando en 29 casos (85% de los pacientes estudiados) un patrón restrictivo pulmonar, que se consideró grave en 10 pacientes (un tercio de los estudiados), mientras que la alteración de la DLCO fue observada en 18 casos (más de la mitad de los pacientes estudiados); el estudio tomográfico reveló la existencia de un patrón de fibrosis pulmonar en el 70% de los casos.

Estos resultados son superponibles a los recogidos en otras series de la bibliografía médica¹²¹. Así, Bodolay et al¹²⁴, recientemente publicaron un amplio estudio retrospectivo en 144 pacientes diagnosticados de EMTC según los criterios de Alarcón-Segovia y encontraron que dos terceras partes de los pacientes estudiados presentaban enfermedad intersticial pulmonar.

Saito et al¹²⁵ observaron una menor frecuencia de afectación intersticial, pero aún así fue del 48%. La asociación entre fenómeno de Raynaud y afectación pulmonar vascular en forma de HTAP o neumopatía intersticial, aunque coherente desde un punto de vista científico y bien descrito en la bibliografía médica¹²⁶⁻¹²⁸ no pudo evidenciarse en nuestro estudio, aunque ello podría deberse al escaso número de pacientes estudiado debido a la rareza de la enfermedad.

Entre las manifestaciones gastrointestinales, la región que con mayor frecuencia se ve afectada es el esófago. Los trastornos de la motilidad esofágica y la alteración del esfínter esofágico inferior (EEI) son las alteraciones más frecuentes. En un 39% de nuestros pacientes se detectó dismotilidad esofágica con afectación predominante de los 2/3 inferiores del esófago, objetivándose afectación en forma de hipotonía del EEI. Sin embargo la presencia de disfagia como manifestación clínica fue mucho menor (menos del 10%). La afectación esofágica realmente es importante más que como marcador pronóstico vital de la enfermedad como marcador de morbilidad, ya que se han detectado episodios recurrentes de broncoaspiración que podrían explicar en parte la afectación intersticial que desarrollan los pacientes con EMTC. Nosotros no encontramos asociación, sin embargo, entre neumonitis intersticial y alteraciones esofágicas, por lo que nuestros resultados no apoyan esta posibilidad. Otras series de pacientes con EMTC recogen una prevalencia de anomalías esofágicas que oscila entre el 43% y el 88%, pero en todas ellas las manifestaciones clínicas en forma disfagia son menores^{129,130}.

En nuestro estudio sólo una paciente presentó molestias gástricas del tipo dispepsia de difícil control; el resto del tubo digestivo no se encontró afectado en los pacientes con EMTC de esta serie.

Existe la creencia que la afectación renal en la EMTC es poco frecuente, y que ante un paciente con nefropatía florida es conveniente descartar otras enfermedades como el lupus o la crisis renal esclerodérmica. Nosotros compartimos esta apreciación, sin embargo diversas series clínicas y necrópsicas recogen un porcentaje de afectación renal en torno al 30%^{131,132}. Las glomerulonefritis mesangial, membranosa y membranoproliferativa son las formas más frecuentes, y su presentación clínica mayoritariamente es en forma de síndrome nefrótico. Fueron pocos los pacientes de nuestro estudio que presentaron afectación renal (5 pacientes; 13%), siendo en forma de glomerulonefritis mesangial y membranoproliferativa en los dos casos que se documentó histológicamente y como síndrome nefrótico en dos casos en los que no se llegó a practicar biopsia renal. Un paciente desarrolló una insuficiencia renal crónica. Ninguno de ellos presentó anticuerpos anti-Sm o anti-DNA.

La afectación muscular en forma de miositis, se presenta en fases tempranas o en la evolución de la enfermedad y rara vez como forma de presentación (en ninguno de nuestros casos fue la forma de inicio). Parece ser más frecuente la pérdida de fuerza en la cintura pélvica que en la escapular. La prevalencia obtenida en este estudio fue similar a la recogida en la bibliografía médica (50-70%)¹³³.

Entre las manifestaciones hematológicas la que parece ser más frecuente además de la anemia normocítica normocrómica propia de las enfermedades crónicas, es la trombocitopenia autoinmune¹³⁴, 5 (13%) de nuestros pacientes presentaron plaquetopenia aunque sólo en un caso se determinó la presencia de anticuerpos antiplaqueta. El resto de citopenias – anemia hemolítica, leucopenia - recogidas en la serie son menos frecuentes pero están bien descritas¹²².

En cuanto a los hallazgos inmunológicos, reseñar que la concordancia entre los anticuerpos anti-RNP por ELISA y los determinados por inmunoprecipitación, no fue absoluta. Así por ELISA de los 34 pacientes estudiados se detectaron 25 positividadades al anti-RNP, mientras que por IP se detectaron 22 pacientes con positividad para el mismo anticuerpo, hecho que apoya la mayor especificidad de la técnica de IP, que muy posiblemente detecta la presencia de antígenos no sólo de forma lineal como la técnica de ELISA sino también de forma conformacional, lo que la hace más específica. Así pues, es deseable su utilización, precisamente con el fin de restringir al máximo el diagnóstico de EMTC aún con el riesgo de perder sensibilidad. Ante una enfermedad que ha sido cuestionada por algunos autores, es importante asegurar que el diagnóstico sea lo más específico posible, dejando de lado formas clínicas dudosas que no hacen más que contribuir a la confusión.

Finalmente, parece que la EMTC evoluciona con el tiempo de tal manera que pueden definirse tres grupos evolutivos distintos¹¹¹: una tercera parte presentan un curso benigno y quedan asintomáticos con el paso del tiempo, otro tercio requiere tratamiento inmunodepresor para controlar parcialmente la enfermedad, y un último tercio presenta un comportamiento agresivo a pesar del tratamiento. Los resultados obtenidos del análisis retrospectivo en nuestros pacientes a partir de la entrevista actual, revela que 17 (44%) están asintomáticos, 17 (44%) presentaban síntomas leves y moderados, 4 (10%) habían fallecido y 2 (5%) presentaban un curso agresivo de la enfermedad (ambas con HTAP). En 14 (36%) pacientes se precisó tratamiento con diversos inmunodepresores. La naturaleza retrospectiva del estudio dificulta en parte la interpretación de los resultados, pero en cualquier caso parece existir una tendencia a formas menos agresivas de la enfermedad. Ello podría deberse, como se ha comentado anteriormente a que los pacientes más graves hubieran fallecido sin un diagnóstico adecuado, debido a la rapidez de su evolución clínica.

La contracción del epítipo, que comporta una negativización de los anticuerpos anti-RNP en sus diferentes determinaciones (por ELISA en el estudio actual), podría ser el fenómeno inmunológico que señale al grupo de pacientes con un mejor pronóstico, si bien existe una controversia respecto a este punto en la bibliografía médica que en el siguiente apartado intentaremos clarificar.

c.- CONTRACCIÓN DEL EPÍTOPO

En la década de los noventa se introdujo el término de expansión (*spreading*) del epítipo para describir la capacidad inmunológica dependiente de las células B y T de amplificar la respuesta inmune de un único determinante antigénico a varios epítopos del mismo autoantígeno⁷⁶. Este fenómeno puede considerarse hasta cierto punto fisiológico ya que favorece la eficacia de la respuesta inmune frente a diversos patógenos. Esta expansión del epítipo antigénico favorece el reconocimiento de nuevos epítopos en la misma molécula (*molecular spreading*), así como de nuevos epítopos de proteínas que están asociadas en un mismo complejo macromolecular (*intermolecular spreading*) como por ejemplo el *spliceosoma*.

Aplicando este concepto a las enfermedades autoinmunes, y en concreto a la EMTC permite la siguiente interpretación etiopatogénica: una agresión externa, generalmente un virus, altera las células y las estructuras celulares – la alteración del *spliceosoma* en células apoptóticas las hace más inmunogénicas¹³⁵- desencadenando inicialmente una respuesta inmune frente a determinados epítopos – inicialmente frente a U1-RNP 70 kD – expandiendo la respuesta inmunológica a las proteínas de la macromolécula –el *spliceosoma*- favoreciendo la aparición de nuevos autoanticuerpos –frente a U1-RNP A, U1-RNP C, e incluso frente a la proteínas del antígeno Sm-.

Este proceso sucede a lo largo del tiempo y de igual manera que se produce esta “generalización” de la respuesta inmune, también en algunos casos llega a agotarse, es lo que denominamos la contracción del epítipo que se acompaña de la negativización progresiva de los distintos anticuerpos hasta su desaparición.

Existen suficientes evidencias que permiten afirmar que en la EMTC éste podría ser el modelo de respuesta inmunológica. Greidinger y Hoffman¹³⁶ analizaron la especificidad antigénica en una serie amplia de pacientes con anticuerpos anti-RNP recogidos secuencialmente durante años y observaron que los primeros anticuerpos que aparecían eran frente a U1-RNP 70 kD, luego al cabo de un tiempo, meses o años, aparecían frente a U1-RNP A y U1-RNP C y posteriormente frente al resto de RNP. Posteriormente Burdt et al⁴⁹ en el seguimiento de la serie inicial de pacientes con EMTC publicada por Sharp pudieron apreciar el fenómeno contrario, es decir, algunos de los pacientes (11 de 47; 23%) con EMTC presentaron durante el seguimiento una negativización progresiva de los anticuerpos frente a los distintos componentes de snRNP, es decir una “contracción del epítipo” que se acompañaba, en su caso, de una mejoría clínica de los pacientes.

El fenómeno de expansión inmunológica del epítipo se representa en la figura 5, tomada de Monneaux F and Muller S⁷⁷.

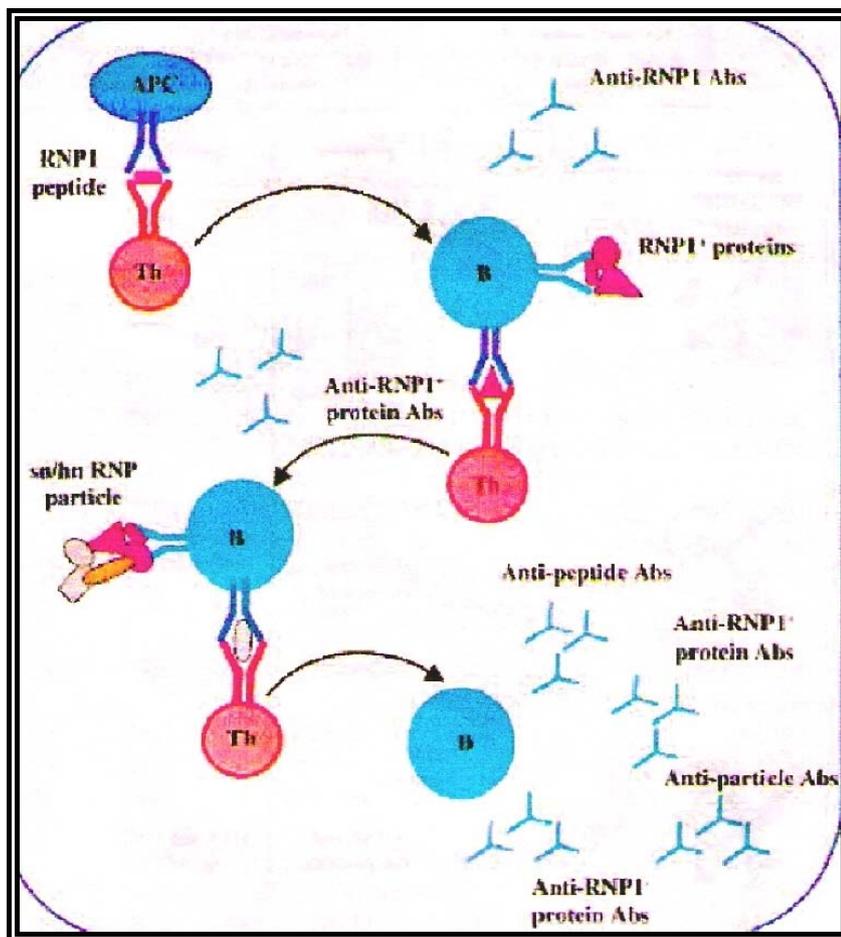


Figura 5. Fenómeno de expansión inmunológica del epítipo.

El agotamiento de la respuesta inmune también lo pudimos comprobar en nuestro grupo de pacientes. De los 38 pacientes diagnosticados de EMTC, se pudo estudiar dicho fenómeno en 34 pacientes, dado que 4 de ellos eran éxitus en el momento del estudio, no pudiéndose extraer suero para la determinación inmunológica. De los 34 pacientes, se observó dicho fenómeno en 9 (26,5%) pacientes usando como técnica inmunológica el ELISA frente al complejo snRNP. La mayoría de los pacientes con negativización de los autoanticuerpos estaban asintomáticos (67%). A pesar de dicho resultado, no se hallaba una diferencia estadísticamente significativa, en cuanto a la evolución clínica, con respecto a los pacientes en los que dicho fenómeno no se producía. Por lo tanto, basándonos en nuestros resultados, no podríamos concluir que la negativización de los autoanticuerpos, principalmente cuando hablamos del U1-RNP, es siempre signo de remisión de la enfermedad, aunque sería importante realizar más estudios orientados hacia dicho aspecto. Habría sido interesante valorar el fenómeno de contracción del epítipo por la técnica de inmunoprecipitación, dada la especificidad de la misma, no siendo posible en nuestro caso, dado que no disponíamos del suero inicial de los pacientes para haber realizado las determinaciones en el momento de la inclusión, disponiendo únicamente de los resultados de la inmunoprecipitación en el momento del control.

d- VALORACIÓN DEL MICA Y SISTEMA HLA

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es un grupo de proteínas de la superficie celular cuyas funciones principales son la presentación de antígenos a las células T (linfocitos CD 4⁺ o colaboradores o CD 8⁺ también llamados citotóxicos, según sean estimulados por las proteínas que componen el HLA de clase II o I respectivamente) y definir la naturaleza genética irrepetible de cada individuo.

La existencia de determinados componentes genéticos, que se manifiesten con más frecuencia en los pacientes con EMTC que en otras enfermedades del tejido conectivo, ha sido uno de los pilares que ha ayudado a la consideración de la enfermedad como tal y no como parte constituyente de otras o simplemente como no existente.

Otras enfermedades autoinmunes sistémicas han demostrado estar asociadas con un HLA característico, por ejemplo la artritis reumatoide con el HLA-DR4, el lupus con el HLA-DR2 y DR3, la esclerodermia con el HLA-DR5 y la dermatomiositis con el HLA-DR3⁸³⁻⁹⁰. La asociación de una enfermedad a un determinado HLA le confiere una mayor entidad como proceso independiente. Sin embargo pocos estudios han intentado demostrar la existencia de una asociación entre la EMTC o la positividad para los anticuerpos anti-U1-RNP y un HLA determinado^{82,91,96}. La mayoría de estos estudios demuestran una asociación específica con el HLA-DR4, aunque algunos autores lo restringen al grupo de pacientes con EMTC y artritis⁴⁰.

Hoffman et al⁹¹ demuestran una relación significativa entre la presencia del HLA-DRB1*04 y HLA-DRw53 en pacientes con enfermedad del tejido conectivo con U1-RNP 70 kd en comparación con los pacientes con LES y anti-U1-RNP 70 kd y el grupo control. En la serie de pacientes con EMTC que se estudia en esta Tesis Doctoral, se pudo analizar el sistema HLA en 31 pacientes, sin que fuéramos capaces de encontrar diferencias significativas en la frecuencia del HLA-DR4 ni en otros HLA estudiados al compararlos con un grupo control de donantes sanos, aunque si se detectó una mayor frecuencia del HLA-DR4 (35,4%). Tampoco encontramos asociaciones entre determinadas manifestaciones clínicas como la presencia de patrón restrictivo pulmonar y HLA-DR3 o artralgias y HLA-DR4, habitualmente recogidas en la bibliografía médica

Hassan et al⁹⁶ en un reciente estudio llevado a cabo en la población sueca comparó 24 pacientes con EMTC con un grupo de 229 controles sanos, encontrando que el haplotipo MICA4/HLA-DRB1*04/TNF1 es más frecuente en pacientes con EMTC que en el grupo control. El haplotipo, recordemos que es la constitución genética de un cromosoma individual, pudiéndose referir a un sólo "locus" o a un genoma completo; en este caso el MICA (**MHC I, Chain-related gene A**), corresponde al sistema de histocompatibilidad tipo I, el HLA-DRB1*04 al de tipo II, y el TNF1 al gen relacionado del factor de necrosis tumoral. Nosotros determinamos parcialmente este haplotipo (HLA-I y II) en 30 pacientes de nuestro grupo con EMTC.

Inicialmente, estudiamos la combinación del MICA 4 y MICA 5.1, en relación con la presencia o no del HLA-DRB1*04. Así, se determinó el haplotipo MICA4/DRB1*04, MICA5.1/DRB1*04, MICA4/no DRB1*04, MICA5.1/no DRB1*04, no hallándose una representación significativamente mayor de los mismos en nuestros pacientes con respecto al grupo control. Sin embargo el haplotipo MICA4/DRB1*04, fue positivo en 2 de 30 pacientes y en ninguno de los controles. Por lo tanto necesitaríamos, quizás, una muestra mayor para valorar esta relación.

Así mismo, en el estudio comentado previamente⁹⁶ no tan sólo estudiaron el haplotipo completo, sino que estudiaron diversos genotipos del MICA. Observaron que el genotipo MICA 5.1-5.1 era más frecuente en pacientes con EMTC que en el grupo control, y presentar el alelo MICA 5.1-5.1 se consideraba un factor de riesgo para padecer la enfermedad, así como el MICA 9 un factor protector ya que estaba más presente en los pacientes sanos que en los enfermos de forma significativa. En nuestro estudio no pudimos observar dicha relación, ni para el MICA 5.1-5.1 (5 pacientes; 16,7%) ni para el MICA 9. El alelo MICA 5.1 estaba presente en el 73,3% de nuestra serie (22 pacientes) con respecto al 63,3% del grupo control (19 pacientes) datos que no hacían significativa dicha asociación ($p > 0,05$).

Estos resultados podrían justificarse por el pequeño número de la muestra estudiada, o bien por el pequeño número del grupo control. Sin embargo tratándose de un rasgo genético no podemos descartar que las diferencias respecto al estudio de Hassan et al se deban a los distintos rasgos étnicos presentes en ambos grupos estudiados (mediterráneos frente nórdicos).

e.- CRITERIOS DIAGNÓSTICOS. CONCORDANCIA ENTRE LOS CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN

Desde que Sharp en 1972³ consideró la existencia de la enfermedad mixta del tejido conectivo, siempre ha habido polémica en cuanto a su existencia como tal siendo considerada por algunos autores un paso previo a otra enfermedad bien definida. Una de las causas que ha contribuido a dichos comentarios es la presencia de varios criterios de clasificación para el diagnóstico de la EMTC, siendo esto indicativo de la dificultad de definir de forma precisa la enfermedad, y por tanto de la necesidad de criterios más restrictivos¹³⁷.

Smolen⁴ insistió en que la existencia de tres grupos de criterios diagnósticos era debido a la dificultad de unificar conceptos entre los grandes grupos de estudio. La mayor parte de las enfermedades reumáticas sistémicas presentan un criterio diagnóstico único de clasificación, que permite identificar a un paciente como afecto de dicho proceso, como por ejemplo, en el lupus, la esclerodermia, la artritis reumatoide. En el caso de la enfermedad mixta del tejido conectivo, nos encontramos con 4 diferentes criterios de clasificación, que son los criterios de Alarcón-Segovia, los criterios de Sharp, los criterios de Kasuwaka y los criterios de Kahn que no hemos incluido en el estudio por no estar validados, y que son muy similares a los criterios de Alarcón-Segovia, con la excepción de no considerar la esclerodactilia oacroesclerosis en los criterios clínicos e indicarse una concentración mayor de título de autoanticuerpos anti-RNP en los criterios serológicos, por lo que en la mayor parte de los estudios se habla únicamente de los tres primeros criterios de clasificación.

Todos los grupos de criterios, coinciden en la obligatoriedad de la presencia de anticuerpos anti-U1-RNP para el diagnóstico de la enfermedad. Cabe destacar que en el caso de los criterios de Sharp se habla de “posible” EMTC cuando cumple una serie de manifestaciones características de la enfermedad sin la presencia del anti-U1-RNP.

Al analizar los criterios de Sharp, observamos que las manifestaciones clínicas son comunes a otras conectivopatías tales como el lupus, la esclerodermia, la polimiositis y la artritis reumatoide, por lo que hay estudios que ponen de manifiesto la baja especificidad de dichos criterios de clasificación, ya que los pacientes que cumplían dichos criterios, podían cumplir los criterios diagnósticos de otras conectivopatías concretas¹⁰⁸. De hecho, los criterios de Sharp son los únicos que excluyen del diagnóstico de EMTC a aquellos pacientes que presentan anticuerpos anti-Sm dado que dicho autoanticuerpo es muy específico de pacientes con lupus, siendo por esto uno de los grupos de criterios diagnósticos más restrictivos. En el estudio inicial realizado por Sharp³ se estudiaron 25 pacientes con anticuerpos anti-RNP no hallándose en ninguno de ellos anti-Sm, pero hay que tener en cuenta que el estudio fue realizado por técnica de ELISA, por lo que consideró que dicho autoanticuerpo marcaba la diferencia junto la positividad del anti-RNP entre la EMTC y otras conectivopatías (en estudios posteriores utilizando la misma muestra, y como técnica inmunológica la inmunoprecipitación se hallaron algunos casos con anticuerpos anti-Sm positivos junto anticuerpos anti-U1-RNP positivos).

Los criterios de Kasuwaka, se consideran un término medio entre unos y otros, ya que considera entre los criterios clínicos manifestaciones típicas de la EMTC y además obliga al cumplimiento de al menos una manifestación de 2 de los 3 grupos de manifestaciones características de lupus, esclerodermia y polidermatomiositis. Son considerados poco específicos y poco sensibles.

Los criterios diagnóstico de Alarcón-Segovia y Kahn son los de mayor sensibilidad (62,5%, siendo del 81,3% si consideramos las mialgias en lugar de miositis) y especificidad (86,3%), con respecto a los criterios de clasificación de Sharp y los de Kasuwaka, en un estudio realizado a 45 pacientes con anti-RNP positivos¹¹⁹.

El estudio realizado por Alarcón Segovia et al¹³⁸ comparaba también los 3 criterios diagnósticos en una población de 593 pacientes con conectivopatías concretas, 200 pacientes con diagnóstico de lupus, 80 pacientes con diagnóstico de EMTC, 100 pacientes diagnosticados de artritis reumatoide, 80 pacientes con esclerodermia, 53 pacientes con dermato/polimiositis y 80 pacientes con Sjögren primario. Se les aplicó los 3 grupos de criterios, siendo diagnosticados los pacientes con EMTC de forma similar por los 3 grupos, detectándose por Alarcón Segovia los 80 pacientes. De igual forma se pudieron excluir del diagnóstico de EMTC al resto de pacientes con otras conectivopatías en igual medida por los 3 grupos de criterios.

A raíz del estudio expuesto previamente, creímos oportuno valorar la concordancia o acuerdo que podía existir entre los tres grupos de criterios de clasificación, es decir, qué seguridad tenía un clínico cuando éste determinaba que un paciente padecía de EMTC por el cumplimiento de un determinado criterio de clasificación, por ejemplo si cumplía los criterios de Alarcón-Segovia, en coincidir con el diagnóstico realizado por otro clínico que utilizaba para su clasificación los criterios de Kasuwaka o los de Sharp.

Obtuvimos que los grupos de criterios que realmente concordaban o dicho de otra forma, los grupos de criterios que estaban de acuerdo eran los criterios de Alarcón-Segovia y los de Kasuwaka, es decir, existía un acuerdo específico significativo ($p=0,0035$); la probabilidad que si yo diagnosticaba a un paciente como afecto de la enfermedad aplicando los criterios de Alarcón-Segovia también fuera positivo para la misma aplicando los criterios de Kasuwaka era alta. Esta relación no se daba con los criterios de Sharp.

Queremos destacar también que el estudio del acuerdo específico negativo entre el criterio de Alarcón-Segovia y Kasuwaka, es decir los pacientes que no cumplían ninguno de los dos, fue 0, pudiéndose deber a la baja n , pudiendo extrapolar que seguramente con una n mayor el acuerdo negativo también sería pequeño.

Por tanto, a pesar de haber encontrado un acuerdo importante entre estos dos grupos de criterios, sería mucho más práctico, y sobretodo muy importante para la unificación en el diagnóstico de los diferentes grupos de profesionales, el obtener un grupo único de diagnóstico de la enfermedad, fácil de aplicar y que en la medida de lo posible cumpliera con una alta sensibilidad y especificidad.

f.- VALORACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LOS SÍNTOMAS Y CUMPLIMIENTO DE CRITERIOS

Nuestro estudio compara variables relacionadas con las manifestaciones clínicas y pruebas diagnósticas realizadas a los pacientes con EMTC, para lo cual se creó una variable con 2 valores. El interés de este análisis radica en que aquellos pacientes que cumplen 2 o más grupos de criterios diagnósticos, la variable nos indicará que tiene un mayor peso para definir la enfermedad que en aquellos pacientes con un sólo grupo de criterios diagnósticos que los clasifica como enfermos.

Así, para aquellas variables que tendrían un peso clínico para nosotros, tales como fenómeno de Raynaud, esclerodermia, debilidad muscular (éstas con nivel de significación estadística $p < 0,05$), edema de manos, alteración de las pruebas funcionales respiratorias (en forma de patrón restrictivo), (éstas últimas en el límite de significación), destacar que las diferencias entre los pacientes diagnosticados por 2 o más criterios y los que sólo fueron clasificados como enfermos por uno de los tres criterios evaluados son estadísticamente significativas.

Llamaría la atención la presencia como variable relacionada con la EMTC las úlceras orales, más asociada a los pacientes con lupus, pudiéndose justificar que es una manifestación clínica que realmente no pudo objetivarse en ningún enfermo en el momento del interrogatorio, siendo ésta únicamente explicada por el paciente.

La VSG es una variable muy inespecífica ya que estaría presente en múltiples trastornos inflamatorios, pero se encuentra en el grupo cumplimiento, es decir que los pacientes que presentan la VSG elevada en nuestro estudio, la mayoría (82,6%) cumplían 2 o más criterios diagnósticos. Cabe señalar que aún siendo inespecífica, una velocidad muy elevada (>100 mm/h) junto a la presencia de hipergammaglobulinemia es valorada significativamente por el clínico en el diagnóstico de la EMTC.

Manifestaciones como la poliartritis muy frecuente en los pacientes con EMTC, además de no ser significativa estadísticamente, hemos de observar que su presencia en el 72% se relacionará con la categoría cumplimiento pero en el 60% de los casos se relacionará con la categoría no cumplimiento, lo que marca la poca especificidad de la misma, ya que está presente en la mayoría de las conectivopatías.

Se pudo observar en este estudio que manifestaciones muy importantes relacionadas con la enfermedad como la afectación esofágica o la HTAP, no eran estadísticamente significativas en la asociación cumplimiento. Pero si profundizamos en los valores del análisis bivalente, cuando hablamos de la variable HTAP, de los pacientes que la presentan, el 100% cumplen los 3 criterios, hecho muy demostrativo de la especificidad de la misma. Así clínicamente cuando valoramos a un paciente que presenta anti-U1-RNP positivo e hipertensión arterial pulmonar, es lógico pensar que como primera posibilidad diagnóstica tenga una EMTC.

La HTAP es una manifestación que marca el pronóstico de la EMTC, pero hay que tener en cuenta que no suele darse en el debut o fase inicial de la enfermedad, sino que suele detectarse al cabo de unos años de evolución de la enfermedad, por lo que quizás, si nuestro estudio pudiera prolongarse a lo largo del tiempo los resultados serían diferentes, hallando una mayor frecuencia de HTAP.

En cuanto a la variable afectación esofágica, pasaría algo parecido a la HTAP, dado que casi el 80% de los pacientes que la presentan, cumplen 2 o más criterios, a pesar de no ser significativa la asociación con la categoría cumplimiento.

Por tanto queremos remarcar que la estrategia para crear una variable sobre la intensidad de la certeza con la que diagnosticamos a los pacientes de EMTC nos ha aportado una visión diferente y novedosa del tratamiento de los síntomas con respecto al cumplimiento de ciertos criterios diagnósticos cuando se tienen muestras pequeñas debido a las características de prevalencia de la propia patología estudiada.

Pensamos que dicha técnica sería interesante aplicarla en posteriores trabajos a un grupo mayor de pacientes y estudiar si aquellas variables que hemos considerado de respuesta no coincidente con la práctica clínica se corrigen al aumentar la n , así como valorar nuevas variables que pudieran aportar más información sobre la EMTC y establecer unas nuevas vías de muestreo que permitan análisis confirmatorios.

g.- PROPUESTA DE NUEVOS CRITERIOS

La EMTC a pesar de ser una conectivopatía con la que se ha polemizado sobre su existencia casi desde su descubrimiento, es una enfermedad que presenta unas características clínicas, inmunológicas y genéticas propias.

Nuestro reto fue apoyar aquellos estudios que consideraban la EMTC como una entidad propia, distinguible de las otras conectivopatías, descartando la idea de considerarla como una fase evolutiva de otras enfermedades sistémicas. La existencia de 3 grupos de criterios diferentes, sugería que ésta era una de las causas que dificultaba su reconocimiento.

Uno de nuestros objetivos fue proponer un grupo de criterios único que permitiera definir de forma fácil y eficiente a los pacientes afectados de EMTC. Para ello se utilizaron técnicas de análisis exploratorio de datos multivariable, donde se intentaban cotejar diversas manifestaciones típicas y características de la enfermedad y ver qué peso tenían entre nuestros pacientes y las relaciones que se establecen entre ellas para poder definir los componentes de un único grupo de criterios diagnósticos donde estuvieran representados la mayoría de los pacientes.

Para el estudio del análisis multivariante, seleccionamos aquellas variables que mejor identificaban la enfermedad. Pensamos que si recogíamos una serie de variables presentes en nuestro grupo de pacientes e intentábamos valorar cuántas se relacionaban con un mayor cumplimiento de criterios diagnósticos, seguramente éstas estarían definiendo con mayor peso a la

enfermedad. Por tanto las variables incluidas fueron las que presentaban una asociación estadística con la variable cumplimiento de 2 o más criterios.

A la hora de valorar los resultados gráficos, pudimos observar como los grupos de criterios diagnósticos estaban muy próximos, por lo que parece que todos ellos quieren explicar lo mismo, la misma enfermedad, puntualizando en la mayor proximidad de los criterios de Alarcón-Segovia y Kasuwaka, lo que ya se había demostrado previamente cuando hablábamos de la concordancia de criterios.

Las variables que se expresan gráficamente más centrales como fenómeno de Raynaud, edema de manos, afectación esofágica, afectación cutánea, VSG alta y esclerodactilia dan a entender que representan con mayor poder la enfermedad; mientras que las variables alteración de enzimas musculares, debilidad muscular, fotosensibilidad o úlceras orales están más distantes al eje o factor 2, y por tanto representan en menor medida la enfermedad a estudio y más a otras conectivopatías como el lupus o las miopatías inflamatorias.

Muy interesante resulta la posición gráfica de las tres variables del recuadro inferior izquierdo, la HTAP, la esclerodermia y la afectación de las pruebas funcionales en forma de patrón restrictivo grave, todas ellas muy características de la esclerodermia. Recordemos que en algunos estudios las manifestaciones del tipo de la esclerodermia persisten en el tiempo mientras que las manifestaciones lúpicas tienden a desaparecer, por lo que es importante que estas variables se expongan en dicha representación gráfica, principalmente la HTAP y la afectación pulmonar en forma de patrón restrictivo grave, ya que serán las que marcarán el pronóstico de la enfermedad.

Concluimos tras el estudio detallado de nuestra muestra que los pacientes que presentan positividad para los anticuerpos anti-U1-RNP por IP y manifestaciones tales como fenómeno de Raynaud, edema de manos, esclerodactilia, afectación esofágica y afectación pulmonar restrictiva deben ser considerados los más representativos de EMTC.

Así mismo, decidimos valorar qué número de variables era necesario para proponer dicho criterio como capaz de realizar un buen cribado entre la población, determinando que aquel que cumpliera al menos 3 variables clínicas sería el más adecuado; no obstante, a la hora de implementar estudios clínicos y ensayos terapéuticos en pacientes con EMTC, es deseable utilizar los criterios más restrictivos. En este supuesto, y según nuestros resultados, la inclusión de pacientes que cumplan el requisito inmunológico (anti-U1 RNP) y las 5 variables clínicas, incluirán al 100% de los pacientes con supuesta EMTC, aún a riesgo de perder algún caso.

Finalmente, creemos que el proponer un grupo de criterios diagnósticos único, abrirá las puertas a posteriores estudios donde se pueda valorar su capacidad operativa así como la sensibilidad y especificidad para clasificar a los pacientes con EMTC, siendo necesarios estudios con mayor número de pacientes para corroborar los diversos resultados hallados en la presente tesis.

E- CONCLUSIONES

1.- Las manifestaciones clínicas recogidas en esta serie no difieren, en términos generales, de las publicadas en la bibliografía médica.

2.- El fenómeno de Raynaud y la afectación articular fueron las manifestaciones más frecuentes al inicio y en el curso de la enfermedad. Destaca la disnea como forma de presentación al debut.

3.- El pulmón en forma de neumonitis intersticial (89%) o HTAP (18%) y el esófago en forma de alteraciones de la motilidad (39%) fueron los órganos internos afectados con mayor frecuencia.

4.- Se encontró una asociación significativa entre las variables fenómeno de Raynaud y positividad para anti-U1 RNP por IP, lo que permite hasta cierto punto atribuirles un papel patogénico.

5.- Una tercera parte de los pacientes con EMTC presentó el fenómeno de la contracción del epítipo. Aunque más de la mitad de los pacientes permanecían asintomáticos, no se pudo demostrar una asociación estadísticamente significativa con un mejor pronóstico clínico.

6.- Aunque la concordancia entre ambas técnicas fue estadísticamente significativa ($p=0,04$), no en todos los pacientes positivos para anti-RNP por ELISA se confirmó el resultado mediante IP. Ello podría deberse a la capacidad de esta última técnica para reconocer el antígeno en forma conformacional.

7.- El HLA-DR4 no fue más frecuente estadísticamente (35,4%) en los pacientes con EMTC que en el grupo control (13%). El estudio del haplotipo MICA4/DRB1*04 y de los alelos MICA 5.1-5.1 y MICA 5.1 fue más frecuente en los pacientes con EMTC pero sin alcanzar significación estadística.

8.- La concordancia entre los diferentes criterios diagnósticos fue insuficiente. Sólo se halló concordancia estadísticamente significativa entre los criterios de Alarcón-Segovia y Kasuwaka.

9.- En base a los resultados de esta serie, se proponen unos nuevos criterios diagnósticos: presencia de anticuerpos anti-U1 RNP por inmunoprecipitación y 5 criterios clínicos: fenómeno de Raynaud, esclerodactilia, edema de manos, afectación esofágica y neumonitis intersticial.

10.- Consideramos que los resultados clínico-inmunológicos y genéticos obtenidos en este estudio apoyan el concepto de que la EMTC es una enfermedad con entidad propia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.- Klemperer P, Pollack AP, Baehr G. Diffuse collagen disease acute disseminated lupus erythematosus and diffuse scleroderma. JAMA. 1942; 119:331-2.

2.- Fries JF, Hochberg MC, Medsger TA Jr, Hunder GG, Bombardieri C. American College of Rheumatology Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Criteria for rheumatic disease. Different types and different functions. Arthritis Rheum. 1994;37:454-62.

3.- Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Hofman RH. Mixed connective tissue disease-an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). Am J Med. 1972;52:148-59.

4.- Smolen JS, Steiner G. Mixed connective tissue disease. To be or not to be? Arthritis Rheum. 1998;41:768-77.

5.- Sharp GC, Hoffman RW. Clinical, immunologic, and immunogenetic evidence that mixed connective tissue disease is a distinct entity. Arthritis Rheum. 1999;42:190-1.

6.- Isenberg D, Black C. Naming names! Arthritis Rheum. 1999;42:191-6.

7.- Hoffman RW, Greidinger EL. Mixed connective tissue disease. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12:386-90.

8.- Sharp GC. Mixed connective tissue disease: a concept which stood the test of time. *Lupus.* 2002;11:333-9.

9.- Zdrojewicz Z, Budzyn-Koziol E, Pulawska J. Mixed connective tissue disease: etiology, pathogenesis, clinical significance, treatment. *Postepy Hig Med Dosw.* 1999;53:751-66.

10.- Mukerji B, Hardin JG. Indifferentiated, overlapping and mixed connective tissue diseases. *Am J Med Sci.* 1993;305:114-9.

11.- Ruiz-Pombo M, Labrador-Horrillo M, Selva-O'Callaghan A. Enfermedad mixta del tejido conjuntivo, conectivopatía indiferenciada y síndromes de superposición. *Med Clin (Barc).* 2004;123:712-7.

12.- Zhang XW, Liu X, Li ZG. Clinical features of undifferentiated connective tissue diseases: analysis of 145 patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2006;86:2458-61.

13.- Nimelstein SH, Brody S, Mcshane D and Holman HR. Mixed connective tissue disease: A subsequent evaluation of the original 25 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1980;59:239-48.

14.- Simmons-O'Brien E, Chen S, Watson R, Antoni C, Petri M, Hochberg M et al. One hundred anti-Ro (SS-A) antibody positive patients: a 10-year follow-up. *Medicine (Baltimore)*. 1995;74:109-30.

15.- Greer JM, Panush RS. Incomplete lupus erythematosus. *Arch Intern Med*. 1989;149:2473-6.

16.- Stahl Hallengren C, Nived O, Sturfelt G. Outcome of incomplete systemic lupus erythematosus after 10 years. *Lupus*. 2004;13:85-8.

17.- Bodolay E, Csiki Z, Szekanecz Z, Ben T, Kiss E, Zeher M, et al. Five year follow-up of 665 Hungarian patients with undifferentiated connective tissue disease (UCTD). *Clin Exp Rheumatol*. 2003;21:313-20.

18.- Mosca M, Tavoni A, Neri R, Bencivelli W, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases: the clinical and serological profiles of 91 patients followed for at least one year. *Lupus*. 1998;7:95-100.

- 19.- Williams HJ, Alarcon GS, Joks R, Steen VD, BulpittK, Clegg DO, et al. Early undifferentiated connective tissue disease. An inception cohort after 10 years: Disease remissions and changes in diagnoses in well established and undifferentiated connective tissue diseases. *J Rheumatol.* 1999;26:816-25.
- 20.- Venables PJ. Polymyositis-associated overlap syndromes. *Br J Rheumatol.* 1996;35:305-6.
- 21.- Pope JE. Scleroderma overlap syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2002;14:704-10.
- 22.- Ioannou Y, Sultan S, Isenberg DA. Myositis overlap syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 1999;11:468-74.
- 23.- Oddis CV, Okaro Y, Rudert WA, Trucco M, Duquesnoy RJ, Medgser TA Jr. Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum.* 1992;35:1211-7.
- 24.- Brouwer R, Vree Egberts WT, Hengstman GJ, Raijmakers R, Van Engelen BG, Seelig HP, et al. Autoantibodies directed to novel components of the PM/Scl complex, the human exosome. *Arthritis Res.* 2002;4:134-8.

25.- Raijmakers R, Renz M, Wiemann C, Egberts WV, Seelig HP, Van Venrooij WJ, et al. PM-Scl-75 is the main autoantigen in patients with the polymyositis/scleroderma overlap syndrome. *Arthritis Rheum.* 2004;50:565-9.

26.- Selva O'Callaghan A, Mijares Boeckh-Bherens T, Labrador Horrillo M, Grau Junyent J, Solans Laque R, Vilardell Tarrés M. Anti-PM-Scl antibodies in a patient with inclusion body myositis. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42:1016-8.

27.- Selva-O'Callaghan A, Labrador-Horrillo M, Vilardell-Tarrés M. Case 26-2001: scleroderma renal crisis and polymyositis. *N Engl J Med.* 2002;346:1916-8.

28.- Mimori T, Hinterberger M, Pettersson I, Steitz JA. Autoantibodies to the U2 small nuclear ribonucleoprotein in a patient with scleroderma-polymyositis overlap syndrome. *J Biol Chem.* 1984;259:560-5.

29.- Kubo M, Ihn H, Kuwana M, Asano Y, Tamaki T, Yamare K. Anti-U5 snRNP antibody as a possible serological marker for scleroderma-polymyositis overlap. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41:531-4.

30.- Franceschini F, Cavazzana I, Generali D, Quintzanini M, Viardi L, Ghirardello A, et al. Anti-Ku antibodies in connective tissue diseases: clinical and serological evaluation of 14 patients. *J Rheumatol.* 2002;29:1393-7.

- 31.- Simon JA, Granados J, Cabiedes J, Morales JR, Varela JA. Clinical and immunogenetic characterization of Mexican patients with "Rhupus". *Lupus*. 2002;11:287-92.
- 32.- Panush RS, Edwards NL, Longley S, Webster E. "Rhupus" syndrome. *Arch Intern Med*. 1988;148:1633-6.
- 33.- Cohen MG, Webb J. Concurrence of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: report of 11 cases. *Ann Rheum Dis*. 1987;46:853-8.
- 34.- Reynolds TB, Denison EK, Frankl HD, Lieberman FL, Peters RL. Primary biliary cirrhosis with scleroderma, Raynaud's phenomenon and telangiectasia. New syndrome. *Am J Med*. 1971;50:302-12.
- 35.- Fonollosa V, Simeon CP, Castells L, García F, Castro A, Solans R, et al. Morphologic capillary changes and manifestations of connective tissue diseases in patients with primary biliary cirrhosis. *Lupus*. 2001;10:628-31.
- 36.- Marasini B, Gagetta M, Rossi V, Ferrari P. Rheumatic disorders and primary biliary cirrhosis: an appraisal of 170 italian patients. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:1046-9.

- 37.- Garcia EB, Schur PH, Lahita R, and the american college of rheumatology ad hoc committee on immunologic testing guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: Anti-Sm and Anti-RNP antibody tests. *Arthritis Rheum.* 2004;51:1030-44.
- 38.- Van Eenennaam H, Vogelzangs JHP, Bisschops L, Te Boome LCJ, Seelig HP, Renz M, et al. Autoantibodies against small nucleolar ribonucleoprotein complexes and their clinical associations. *Clin Exp Immunol.* 2002;130:532-540.
- 39.- Van den Hoogen FH, Spronk PE, Boerbooms AM, Bootsma H, De Rooij DJ, Kallenberg CG, et al. Long-term follow-up of 46 patients with anti-(U1)snRNP antibodies. *Br J Rheumatol.* 1994;33:1117-20.
- 40.- Gendi NST, Welsh KI, Van Venrooij WJ, Vancheeswaran R, Gilroy J, Black CM. HLA type as a predictor of mixed connective tissue disease differentiation. Ten year clinical and immunogenetic follow-up of 46 patients. *Arthritis Rheum* 1995;38:259-66.
- 41.- Lundberg I, Hedfors E. Clinical course of patients with Anti-RNP antibodies. A prospective study of 32 patients. *J Rheumatol.* 1991;18:1511-9.
- 42.- Hernández Beriain JA, Pérez Ortiz C, Hermosa MJ, Manuel Díaz J,. Hipertensión pulmonar de rápida evolución como manifestación principal de la enfermedad mixta del tejido conectivo. *Med Clin (Barc).* 2001;116:77-8.

43.- Bodolay E, Szekanecz Z, Dévényi K, Galuska L, Csípo I, Vègh J, et al. Evaluation of interstitial lung disease in mixed connective tissue disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44:651-61.

44.- Haroon N, Nisha RS, Chandran V, Bharadwaj A. Pulmonary hipertension not a major feature of early mixed connective tissue disease: A prospective clinicoserological study. *J Postgrad Med*. 2005;51:104-8.

45.- Vlachoyiannopoulos PG, Guialis A, Tzioufas G, Moutsopoulos HM. Predominance of IgM anti-U1RNP antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. 1996;35:534-41.

46.- Alarcón-Segovia D, Villareal M. Classification and diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. En: Kasuwaka R, Sharp GC, editors. *Mixed connective diseases and antinuclear antibodies*. Amsterdam: Elsevier, 1987;33-40.

47.- Kasuwaka R, Tojo T, Miyawaki S. Preliminary diagnostic criteria for classification of mixed connective tissue disease. En: Kasuwaka R, Sharp GC, editors. *Mixed connective tissue diseases and antinuclear antibodies*. Amsterdam: Elsevier, 1987;41-7.

48.- Sharp GC. Diagnostic criteria for classification of MCTD. En: Kasuwaka R, Sharp GC, editors. *Mixed connective tissue diseases and antinuclear antibodies*. Amsterdam: Elsevier, 1987;p.23-32.

49.- Burdt MA, Hoffman RW, Deutscher SL, Wang GS, Johnson JC, Sharp GC. Long-term outcome in mixed connective tissue disease. Longitudinal clinical and serological findings. *Arthritis Rheum.* 1999;42:899-909.

50.- De Rooij DJ, Habets WJ, Van de Putte LB, Hoet MH, Verbeek AL, Van Venrooij WJ. Use of recombinant RNP peptides 70 kd and A in an ELISA for measurement of antibodies in mixed connective tissue disease: a longitudinal follow up of 18 patients. *Ann Rheum Dis.* 1990;49:391-5.

51.- Snowden N, Hay E, Holt PJ, Bernstein R. Clinical course of patients with Anti-RNP antibodies. *J Rheumatol.* 1993;20:1256-8.

52.- Scheja A, Elborgh R, Wildt M. Decreased capillary density in juvenile dermatomyositis and in mixed connective tissue disease. *J Rheumatol.* 1999;26:1377-81.

53.- Doria A, Bonavina L, Anselmino M, Ruffatti A, Favaretto M, Gambari P, et al. Esophageal involvement in mixed connective tissue disease. *J Rheumatol.* 1991;18:685-90.

54.- Gutierrez F, Valenzuela JE, Ehresmann GR, Quismorio FP, Kitridou RC. Esophageal dysfunction in patients with mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Dig Dis Sci.* 1982;27:592-7.

55.- Marshall JB, Kretschmar JM, Gerhardt DC, Winship DH, Winn D, Treadwell EL, et al. Gastrointestinal manifestations of mixed connective tissue disease. *Gastroenterology*. 1990;98:1232-38.

56.- Lundberg IE. Cardiac involvement in autoimmune myositis and mixed connective tissue disease. *Lupus*. 2005;14:708-12.

57.- Alpert MA, Goldberg SH, Singen BH. Cardiovascular manifestations of mixed connective tissue disease in adults. *Circulation*. 1983;68:1182-1193.

58.- Vegh J, Szodoray P, Kappelmayer J, Csipo I, Udvardy M, Lakos G, et al. Clinical and immunoserological characteristics of mixed connective tissue disease associated with pulmonary arterial hypertension. *Scand J Immunol*. 2006;64:69-76.

59.- Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Fujinami M, Uwatoko S, Kinoshita M, Sumiya M. Up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and class II MHC molecules on pulmonary artery endothelial cells by antibodies against U1-ribonucleoprotein. *Clin Exp Immunol*. 1999;116:174-80.

60.- Nagashima T, Masayuma JI, Okubo H, Minota S. Marked dilatation of pulmonary arteries in mixed connective tissue disease. *J Rheumatol*. 2005;32:6.

61.- Uzu T, Iwatani H, Ko M, Yamato M, Takahara K, Yamauchi A. Minimal change nephrotic syndrome associated with mixed connective tissue disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16:1299-300.

62.- Fujimoto M, Kira J, Murai H, Yoshimura T, Takizawa K, Goto I. Hypertrophic cranial pachymeningitis associated with mixed connective tissue disease: a comparison with idiopathic and infectious pachymeningitis. *Intern Med.* 1993;32:510-2.

63.- Ahmadi-Simab K, Lamprecht P, Reuter M, Gross WL. Pachymeningitis in mixed connective tissue disease. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1656-7.

64.- Oh YB, Jun JB, Kim CK, Lee CW, Park CK, Kim TY, et al. Mixed connective tissue disease associated with skin defects of livedoid vasculitis. *Clin Rheumatol.* 2000;19:381-4.

65.- Leslie D, Lipsky P, Notkins AL. Autoantibodies as predictor of disease. *J Clin Invest.* 2001;108:1417-22.

66.- Hoffman RW, Gazitt T, Foeking MF, Ortmann RA, Misfeldt M, Jorgenson R, et al. U1 RNA induces innate immunity signaling. *Arthritis Reum.* 2004;50:2891-96.

- 67.- Murakami A, Kojima K, Ohya K, Imamura K, Takasaki Y. A new conformational epitope generated by the binding of recombinant 70kd protein and U1-RNA to Anti-U1 RNP autoantibodies in sera from patients with mixed tissue connective disease. *Arthritis Rheum.* 2002;46:3273-82.
- 68.- Ikeda K, Takasaki Y, Hirokawa K, Takeuchi K, Hashimoto H. Clinical significance of antibodies to TS1-RNA in patients with mixed connective tissue disease. *J Rheumatol.* 2003;30:998-1005.
- 69.- Greidinger EL, Casciola-Rosen L, Morris SM, Hoffman RW, Rosen A. Autoantibody recognition of distinctly modified forms of the U1-70-kd antigen is associated with different clinical manifestations. *Arthritis Rheum.* 2000;43:881-8.
- 70.- Hof D, Cheung K, de Rooij DJ, Van den Hoogen FH, Pruijn GJM, Van Venrooij WJ, Raats JMH. Autoantibodies specific for U1-70 kd are superior serological markers for mixed connective tissue disease. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:R302-9.
- 71.- Hof D, Raats MH, Pruijn GJM. Apoptotic modifications affect the autoreactivity of the U1 snRNP autoantigen. *Autoimmun Rev.* 2005;4:380-8.
- 72.- Newkirk MN, Van Venrooij W, Marshall G. Autoimmune response to U1 small nuclear ribonucleoprotein (U1snRNP) associated with cytomegalovirus infection. *Arthritis Res.* 2001;3:253-8.

73.- Foster HE, Malleson PN, Petty RE, Cabral DA. Anti-RNP antibody in a child with undifferentiated carcinoma and no evidence of mixed connective tissue disease. *Br J Rheumatol.* 1997;36:289-91.

74.- Lin YC, Wu CC, Ou TT, Yen JH, Liu HW, Tsai WC. Malignant thymoma associated with mixed connective tissue disease: a case report. *Clin Reumatol.* 2006;25:262-4.

75.- Matsumoto Y, Okano MM, Sato K. Mixed connective tissue disease and Sjögren syndrome, accompanied by HTLV-I infection. *Intern Med.* 1993;32:449-54.

76.- Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature.* 1992;358:155-7.

77.- Monneaux F, Muller S. Epitope spreading in systemic lupus erythematosus. Identification of triggering peptide sequences. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1430-38.

78.- Mendoca LL, Amengual O, Atsumi T, Kamashta MA, Hughes GR. Most anticardiolipin antibodies in mixed connective tissue disease are beta₂-glycoprotein independent. *J Rheumatol.* 1998;25:189-90.

79.- Komatireddy GR, Wang GS, Sharp GC, Hoffman RW. Antiphospholipid antibodies among anti-U1-70 kDa autoantibody positive patients with mixed connective tissue disease. *J Rheumatol.* 1997;24:319-22.

80.- Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Yazawa N, et al. Serum levels of anti-agalactosyl IgG antibodies in mixed connective tissue disease. *Br J Dermatol.* 2005;152:806-7.

81.- Hoffman RW, Sharp GC. Is anti-U1-RNP autoantibody positive connective tissue disease genetically distinct? *J Rheumatol.* 1995;22:586-9.

82.- Black CM, Maddison PJ, Welsh KL, Bernstein R, Woodrow JC, Pereira RS. HLA and immunoglobulin allotypes in mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum.* 1988;31:131-4.

83.- Nishikai M, Sekiguchi S. Relationship of autoantibody expression and HLA phenotype in Japanese patients with connective tissue diseases. *Arthritis Rheum.* 1985;28:579-81.

84.- Dong RP, Kimura A, Hashimoto H, Akizuki M, Nishimura Y, Sasazuki T. Difference in HLA-linked genetic background between mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 1993;41:20-5.

85.- Ruuska P, Hameenkorpi R, Forsberg S, Julkunen H, Makitalo R, Ilonen Y, et al. Differences in HLA antigens between patients with mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1992;51:52-5.

86.- Olsen ML, Arnett FC, Reveille JD. Contrasting molecular patterns of MHC Class II alleles associated with the anti-Sm and anti-RNP precipitin autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Reum.* 1993;36:94-104.

87.- Arnett FC, Olsen ML, Anderson KL, Reveille JD. Molecular analysis of major histocompatibility complex alleles associated with the lupus anticoagulant. *J Clin Invest.* 1991;87:1490-5.

88.- Black CM, Welsh KI, Maddison PJ, Jayson MI, Bernstein RM. HLA antigens, autoantibodies and clinical subsets in scleroderma. *Br J Rheumatol.* 1984;23:267-71.

89.- Briggs D, Welsh KI. Major histocompatibility complex class II genes and systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1991;50:862-65.

90.- Kang SH, Park MH, Song EY, Kang SJ, Lee EB, Song YW, et al. Association of HLA Class II Genes with systemic Sclerosis in Koreans. *J. Rheumatol* 2001;28:1577-83.

91.- Hoffman RW, Retten Maier LJ, Takeda Y. Human autoantibodies against the 70 kd polypeptide of U1 small nuclear RNP are associated with HLA-DR4 among connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum.* 1990;33:666-73.

92.- Wolff-Vorbeck G, Hackl W, Fenning S, Krawinkel U, Luhrmann R, Peter HH, Schlesier M. Characterization of an HLA-DR4 restricted T cell clone recognizing a protein moiety of small nuclear ribonucleoproteins. *Clin Exp Immunol.* 1994;95:378-84.

93.- Genth E, Zarnowski H, Mierau R, Wohltmann D, Hartl PW. HLA-DR4 and Gm (1,3;5,21) are associated with U1-nRNP antibodies positive connective tissue disease. *Ann Rheum Dis.* 1987;46:189-96.

94.- Weckmann AL, Granados J, Cardiel MH, Andrade F, Vargas-Alarcón G, Alcocer-Varela J, et al. Immunogenetic of connective tissue disease in an Mexican Mestizo population. *Clin Exp Rheumatol.* 1999;17:91-4.

95.- Hameenkorpi R, Ruuska P, Forsberg S, Tiilikainen A, Makitalo R, Hakala M. More evidence of distinctive features of mixed connective tissue disease. *Scand J Rheumatol* 1993;22:63-8.

96.- Hassan AB, Nikitina-Zaka L, Padyukov L, Karlsson G, Gupta M, Lundberg I, et al. MICA4/HLA-DRB1*04/TNF1 Haplotype is Associated With Mixed Connective Tissue Disease in Swedish Patients. *Human Immunology.* 2003;64:290-6.

97.- Hoffman RW, Takeda Y, Sharp GC, Lee DR, Hill DL, Kaneoka H, Caldwell CW. Human T cell clones reactive against U-small nuclear ribonucleoprotein autoantigens from connective tissue disease patients and healthy individuals. J Immunol. 1993;151:6460-9.

98.- Kessler SW. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J Immunol. 1975;115:1617-24.

99.- Matter L, Schopfer K, Wilhelm JA, Nyffenegger T, Parisot RF, De Robertis EM. Molecular characterization of ribonucleoprotein antigens bound by antinuclear antibodies. A diagnostic evaluation. Arthritis Rheum. 1982;25:1278-83.

100.- Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. Educational and Psychological Measurement. 1960;20:37-46.

101.- Maclure M, Willett WC. Misinterpretation and misuse of the kappa statistic. Am J Epidemiol. 1987;126:161-169.

102.- Cicchetti DV, Feinstein AR. High agreement but low kappa: II. Resolving the paradoxes. J Clin Epidemiol. 1990;43:551-558.

103.- Ubersax JS (2006) : " The tetrachoric and polychoric Correlation coefficients".
[en línea] <[http://ourworld compuserve.com/homepages/jsuebersax/tetra.htm](http://ourworld.compuserve.com/homepages/jsuebersax/tetra.htm)>
[27.07.2007]

- 104.- Lemeshow S, Hosmer DW. Applied Logistic Regression. John Wiley & Sons. 2004.
- 105.- Benzecri, JP. Correspondence analysis handbook. Paris: Dunod. 1992.
- 106.- Becue M, Valls J. Manual de instrucción a los métodos factoriales y clasificación con SPAD. Bellaterra:Universitat Autònoma de Barcelona, Servei d'Estadística. 2002.
- 107.- Greenacre MJ. Correspondence Analysis in Practice. London: Academic Press. 1993.
- 108.- Amigues JM, Cantagrel A, Abbal M, Mazieres B, and the autoimmunity group of the hospitals of Toulouse. Comparative study of 4 diagnosis criteria sets for mixed connective tissue disease in patients with anti-RNP antibodies. J Rheumatol. 1996;23:2055-62.
- 109.- Aringer M, Steiner G, Smolen JS. Does Mixed Connective Tissue Disease Exist? Yes. Rheum Dis Clin North Am. 2005; 31:411-20.
- 110.- Black C, Isenberg DA. Mixed connective tissue disease-goodbye to all that. Br J Rheumatol. 1992;31:695-700.
- 111.- Lundberg IE. The prognosis of mixed connective tissue disease. Rheum Dis Clin North Am. 2005;31:535-47.

112.- Sullivan WD, Hurst DJ, Harmon CE, Esther JH, Agia GA, Maltby JD, et al. A prospective evaluation emphasizing pulmonary involvement in patients with mixed connective tissue disease. *Medicine (Baltimore)* 1984;63:92-107.

113.- Kamata Y, Nara H, Sato H, Masuyama JI, Minota S, Yoshio T. Effect of steroid pulse therapy on mixed connective tissue disease with pulmonary arterial hipertensión. *Ann Rheum Dis.* 2005 ;64 :1236-7.

114.- Coppo P, Clauvel JP, Bengoufa D, Oksenhendler E, Lacroix C, Lassoued K. Inflammatory myositis associated with anti-U1-small nuclear ribonucleoprotein antibodies: a subset of myositis associated with a favourable outcome. *Rheumatology(Oxford).* 2002;41:1040-6.

115.- Vianna AG, Borges TL, Borba EF, Caleiro TC, Bonfa E, Marie KN. Myositis in mixed connective tissue disease. A unique syndrome characterized by immunohistopathologic elements of both polymyositis and dermatomyositis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004;62:923-34.

116.- Satoh M, Akaogi J, Kuroda Y, Dina C, Yoshida H, Yamasaki Y, Reeves WH. Autoantibodies that stabilize U1snRNP are a significant component of human autoantibodies to snRNP and delay proteolysis of Sm antigens in vitro. *J Rheumatol.* 2004;31:2382-89.

117.- Schnabel A, Reuter M, Biederer J, Richter C, Gross WL. Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis: clinical course and response to treatment. *Curr Rheumatol Rep.* 2005;7:99-105.

118.- Selva-O'Callaghan A, Labrador-Horrillo M, Solans-Laque R, Simeon-Aznar CP, Martínez-Gómez X, Vilardell-Tarrés M. Myositis-specific and myositis-associated antibodies in a series of eighty-eight Mediterranean patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum.* 2006;55:791-8.

119.- Swanton J, Isenberg D. Mixed connective tissue disease: still crazy after all these years. *Rheum Dis Clin North Am.* 2005;31:421-36.

120.- Bennett RM, O'Connell DJ. Mixed connective tissue disease: a clinicopathologic study of 20 cases. *Semin Arthritis Rheum.* 1980;10:483-92.

121.- De Angelis R, Cerioni A, Del Médico P, Blasetti P. Raynaud's phenomenon in undifferentiated connective tissue disease (UCTD). *Clin Rheumatol.* 2005;24:145-51.

122.- Pope JE. Other manifestations of mixed connective tissue disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2005;31:519-33.

123.- Asherson RA, Ames D, Coltart J, Byrne C, Hughes GR. Hypertrophic cardiomyopathy in systemic lupus erythematosus and "lupus-like" disease. Chance association? A report of 2 cases. *J Rheumatol.* 1992;19:1973-7.

124.- Bodolay E, Szekanecz Z, Dévényi K, Galuska L, Csípő I, Vègh J, et al. Evaluation of interstitial lung disease in mixed connective tissue disease (MCTD). *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44:656-61.

125.- Saito Y, Terada M, Takada T, Ishida T, Moriyama H, Ooi H, et al. Pulmonary involvement in mixed connective tissue disease: comparison with other collagen vascular diseases using high resolution CT. *J Comput Assist Tomogr*. 2002;26:349-57.

126.- Bull TD, Fagan KA, Badesh DB. Pulmonary vascular manifestations of mixed connective tissue disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005;31:451-64.

127.- Kim P, Grossman JM. Treatment of mixed connective tissue disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005;31:549-65.

128.- Grader-Beck T, Wigley FM. Raynaud's phenomenon in mixed connective tissue disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005;31:465-81.

129.- Marshall JB, Kretschmar JM, Gerhardt DC, Winship DH, Winn D, Treadwell DI, et al. Gastrointestinal manifestations of mixed connective tissue disease. *Gastroenterology*. 1990; 98:1232-8.

130.- Lapadula G, Muolo P, Semeraro F, Covelli M, Brindicci D, Cuccorese G, et al. Esophageal motility disorders in the rheumatic diseases: a review of 150 patients. *Clin Exp Rheumatol*. 1994;12:515-21.

131.- Kitridou RC, Akmal M, Turkel SB. Renal involvement in mixed connective tissue disease: a longitudinal clinicopathological study. *Semin Arthritis Rheum.* 1986;16:135-45.

132.- Sawai T, Murakami K, Kurasono Y. Morphometric analysis of the kidney lesions in mixed connective tissue disease (MCTD). *J Exp Med.* 1994;174:141-54.

133.- Hall S, Hanrahan P. Muscle Involvement in Mixed Connective Tissue Disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2005;31:509-17.

134.- de Rooj DJ, van de Putte LB, van Beusekom HJ. Severe thrombocytopenia in mixed connective tissue disease. *Scand J Rheumatol.* 1982;11:184-6.

135.- Greidinger EL, Foecking MF, Ranatunga S. Apoptotic U1-70 kd is antigenically distinct from the intact form of the U1-70 kd molecule. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1264-9.

136.- Greidinger EL, Hoffman RW. The appearance of U1 RNP antibody specificities in sequential autoimmune human antisera follows a characteristic order that implicates the U1-70 kd and B/B' proteins as predominant U1 RNP immunogens. *Arthritis Rheum.* 2001;44:368-75.

137.- Ruiz-Pombo M, Selva-O'Callaghan A, Martínez-Lostao L, Domínguez-Pareto R, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarrés M. Mixed connective tissue disease: should the diagnosis be more restrictive? Comment on the article of Bodoloy M et al. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44:1465-6.

138.- Alarcón-Segovia D, Cardiel MH. Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. Study of 593 patients. *J Rheumatol*. 1989;16:328-34.
