



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESIS DOCTORAL

---

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS Y  
VALOR PRONÓSTICO DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS  
POCO PREVALENTES EN LA ESCLERODERMIA**

---

**Tesis presentada para optar al grado de Doctor**

**Doctorando:**

Eduardo Luis Callejas Moraga

**Directora:**

Dra. Carmen Pilar Simeón Aznar

**Tutor:**

Dr. Vicent Fonollosa Plá



Universitat Autònoma  
de Barcelona

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Programa de Doctorat en Medicina, Departament de Medicina

Barcelona, 2020



A papá, mamá, Pedro y Pablo



# AGRADECIMIENTOS

Mencionar en pocas palabras a los que me apoyaron y acompañaron en este camino no es tarea fácil. Por otro lado, no quisiera dejar de nombrar a nadie que haya formado parte.

En primer lugar, estoy especialmente agradecido equipo de la Unidad de Esclerodermia del Hospital Vall d'Hebron. No tendré manera de agradecer a Alfredo Guillén el haber sido el que me empujase, cuando yo era tan solo residente de segundo año, a empezar a hacer algún pequeño trabajo, lo que derivó después en más proyectos de investigación y posteriormente en la presente tesis doctoral. También por la dedicación incansable que ha tenido conmigo, su paciencia y su implicación constante. Sin ella, ninguno hubiese llegado a buen término.

A Carmen Pilar Simeón por su derroche de sabiduría constante y enseñarme todo lo que sé de esclerodermia, por animarme a participar en foros de cierta importancia (*“¿Edu, te atreverás a hablar en el Ten Topics? Creo que lo harás muy bien”*), por guiarme en este proyecto y por su revisión exhaustiva de cada línea que he escrito. Sin su dedicación, nada de esto hubiese sido posible. Gracias Carmen, por demostrarme que ser una profesional referente no está reñido con los buenos modos y la humildad.

A Vicent Fonollosa, por dedicar toda su vida profesional a la Esclerodermia y por ser impulsor del interés por la enfermedad no sólo en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Vall d'Hebron sino también a nivel nacional. Te agradezco por haber aceptado ser mi tutor y por todo lo que me has ayudado con tu tutorización.

A las Dras. de Inmunología (Ana Marín, Janire Perurena y Maite Sanz) por su trabajo, dedicación y buena disposición en los proyectos, así como por la revisión detallada de la sección de inmunología del manuscrito.

No me puedo olvidar de todos los adjuntos de la unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del HVH. Especial mención a Albert Selva, por haberme enseñado tanto y haber transmitido con tanta fuerza la pasión por la Medicina Interna y la investigación clínica.

A mis compañeros de residencia, a mis adjuntos de guardia y a todos los residentes mayores que os he tenido como ejemplo (Mar, Jaume, Eloi), por lo que me habéis enseñado y la paciencia que habéis tenido conmigo. También a mis coRs (Olga, Yuri, Marc) y residentes pequeños (Adaia, Albert), por haber hecho de las noches de guardia algo tan divertido.

A mis compañeros actuales de trabajo en el Hospital Parc Taulí. Con los que comparto despacho (Joan, Mac, Marc) porque si las mañanas son amenas, las tardes pueden ser más productivas. Agradezco también a Ricard Comet la confianza depositada en mí.

A mis amigos de Barcelona, especialmente a Luisa, Ana y Alberto porque igual de importante que el trabajo son el ocio y disfrutar del tiempo libre.

A mis padres, por haberme educado en valores donde la bondad y el sacrificio son las herramientas que te ayudarán a conseguir lo que te propongas. Y a mis hermanos, por ser los mejores del mundo.





# ABREVIATURAS

- ACR: American College of Rheumatology
- ACA: anticuerpos anti-centrómero
- ANA: anticuerpos anti-nucleares
- ATAI o Anti-Scl-70: anticuerpos anti-topoisomerasa I
- ARE: antagonista del receptor de endotelina
- ARAI: antagonistas del receptor de la angiotensina II
- BHPR: British Health Professionals in Rheumatology
- BSR: British Society of Rheumatology
- CENP-A: anticuerpos anti centrómero A
- CENP-B: anticuerpos anti centrómero B
- CRE: crisis renal esclerodérmica
- DE: desviación estándar
- DLCO: capacidad de difusión de monóxido de carbono
- EAS: enfermedades autoinmunes sistémicas
- ELISA: inmunoensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- EPI: enfermedad pulmonar intersticial
- EPT: enfermedad pulmonar terminal
- ES o SSc: esclerodermia o esclerosis sistémica
- ET-1: endotelina 1
- EULAR: European League Against Rheumatism
- EUSTAR: EULAR Scleroderma Trials and Research
- FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo
- FR: fenómeno de Raynaud

FRCV: factores de riesgo cardiovascular

FVC: capacidad vital forzada

GAVE: ectasia vascular antral gástrica

GC: glucocorticoides

HAP: hipertensión arterial pulmonar

HLA: antígeno leucocitario humano

HTA: hipertensión arterial

HR: hazard ratio

IBP: inhibidor de la bomba de protones

ICAM: moléculas de adhesión intercelular

IC: intervalo de confianza

IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IFI 16: proteína 16 inducible por interferón gamma

IFP: articulaciones interfalángicas proximales

IL: interleuquina

IP: inmunoprecipitación

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

MCF: articulaciones metacarpofalángicas

MCP-1: proteína quimiotáctica del monocito 1

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteinasa de la matriz

NYHA: asociación de cardiología de Nueva York

PAPm: presión arterial pulmonar media

PCNA: antígeno nuclear de células en ploriferación

## Abreviaturas

PCP: presión capilar pulmonar

PDE5: fosfodiesterasas 5

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFR: pruebas de función respiratoria

POLR3A: gen de la RNA polimerasa III

PSVD: presión sistólica de ventrículo derecho

RESCLE: registro español de esclerodermia

RMN: resonancia magnética nuclear

RNAP III: ácido ribonucleico polimerasa III

RNP: ribonucleoproteína

RVP: resistencias vasculares pulmonares

TC: tomografía computarizada

TCAR: tomografía computarizada de alta resolución

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante-beta

Th2: linfocitos T helper 2

UD: úlceras digitales

VCAM-1: moléculas de adhesión vascular 1

VI: ventrículo izquierdo



# Índice

AGRADECIMIENTOS.....	5
ABREVIATURAS .....	8
RESUMEN.....	16
SUMMARY .....	18
1. INTRODUCCIÓN.....	20
• 1.1 Historia.....	22
• 1.2 Conceptos Generales.....	22
• 1.3 Etiopatogenia .....	24
a) Sistema inmune.....	24
b) Genética .....	25
c) Vasculopatía.....	26
• 1.4 Criterios clasificatorios .....	27
• 1.5 Clasificación en Subtipos clínicos cutáneos .....	28
• 1.6 Manifestaciones clínicas .....	30
• 1.7 Supervivencia y factores pronósticos. ....	32
• 1.8 Tratamiento.....	34
• 1.9 Autoinmunidad en la esclerodermia .....	35
• 1.9.1 Importancia de la autoinmunidad .....	35
• 1.9.2 Métodos de detección .....	39

a) Inmunofluorescencia indirecta.....	39
b) Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....	40
c) Inmunodifusión .....	41
d) Inmunoblot.....	41
e) Tecnología multianalítica basada en partículas (particle-based multi-analyte technology, PMAT).....	42
f) Inmunoprecipitación .....	42
• 1.9.3 Anticuerpos específicos de esclerodermia: descripción y perfil clínico pronóstico.....	43
a) Anti centrómero .....	43
b) Anti topoisomerasa I.....	44
c) Anti RNA polimerasa III .....	44
d) Anti-PM/Scl .....	45
e) Anti-fibrilarina .....	45
f) Anti-Th/To .....	46
g) Anti-Ku .....	46
h) Anti-U1 RNP .....	46
i) Anti-NOR90/hUBF.....	47
j) Anti-U11/U12 .....	47
k) Anti-RuvBL1/2 .....	48
l) Anti-eIF2B .....	48
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	49

•	Estudio de investigación 1: Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNA polimerasa III .....	52
•	Estudio de investigación 2: Prevalencia y Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNPC3 .....	53
3.	OBJETIVOS .....	55
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
•	Estudio de investigación 1: Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNA polimerasa III .....	61
•	Estudio de investigación 2: Prevalencia y Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNPC3 .....	64
5.	RESULTADOS .....	67
•	Estudio de investigación 1: Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNA polimerasa III .....	69
•	Estudio de investigación 2: Prevalencia y Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNPC3 .....	76
6.	DISCUSIÓN GENERAL .....	89
•	Estudio de investigación 1: Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNA polimerasa III .....	93
•	Estudio de investigación 2: Prevalencia y Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNPC3 .....	100
7.	CONCLUSIONES .....	106
8.	LINEAS DE FUTURO .....	110
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	113

10. ANEXO ..... 137



## RESUMEN

La esclerodermia (ES) es una enfermedad autoinmune multisistémica en la que la expresión de anticuerpos específicos tiene implicaciones clínico pronósticas importantes. Los anticuerpos son útiles para predecir las manifestaciones clínicas de la enfermedad, y la expresión de cada uno de ellos confiere un pronóstico diferente. Los anticuerpos más prevalentes de la ES están bien estudiados debido a la disponibilidad de las técnicas de detección de los mismos. Sin embargo, existen anticuerpos específicos que menos prevalentes y menos estudiados pero que clínicamente se asocian a afección orgánica grave.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la prevalencia, las asociaciones clínicas y la supervivencia de dos anticuerpos poco prevalentes en la ES: el anti-RNA polimerasa III (anti-RNAP III) y el anti-RNPC3 o anti-U11/U12.

En el primer estudio se seleccionaron 221 pacientes con ES y se compararon los pacientes positivos para anti-RNAP III (medido mediante ELISA e inmunoblot) frente a los negativos para anti-RNAP III. Describimos una prevalencia del anti-RNAP III de 11.8%. Clínicamente los pacientes que expresaron anti-RNAP III tenían más frecuencia de ES subtipo cutáneo difusa, artritis, crisis renal esclerodérmica (CRE) e hipertensión arterial (HTA). Sin embargo, no hemos encontrado asociación con cáncer ni con ectasia vascular antral gástrica. En relación a la supervivencia, no hubo diferencias en las curvas de Kaplan Meier entre ambos grupos. Los factores independientes asociados a peor pronóstico en la cohorte anti-RNAP III fueron la crisis renal esclerodérmica, la enfermedad pulmonar intersticial (EPI) con FVC < 50% y la hipertensión arterial pulmonar

En el segundo estudio, se seleccionaron 447 pacientes con ES de 2 diferentes centros (Barcelona n = 286 y Milán n = 161), y se compararon los pacientes positivos para anti-RNPC3 (medido mediante PMAT) frente a los pacientes negativos. La prevalencia encontrada fue del 4.3%. Los pacientes con anti-RNPC3 presentaron una mayor frecuencia de EPI, de EPI grave, de enfermedad pulmonar terminal y una peor supervivencia. No se evidenció asociación con cáncer ni con afección gastrointestinal. Los factores de riesgo independientes asociados a peor supervivencia fueron la edad y la presencia de HAP. Los factores de riesgo independientes asociados a peor pronóstico (muerte y/o manifestaciones graves) fueron la presencia de anti-RNPC3, el subtipo cutáneo difusa, la edad al inicio, la presencia de EPI, la HAP y la expresión de ATAI. En el subgrupo con EPI, la supervivencia libre de muerte o manifestaciones graves fue menor en los pacientes que expresaron anti-RNPC3 comparado con los pacientes que expresaron ATAI. El fenotipo clínico descrito en los pacientes que expresan anti-RNPC3 determinado por PMAT es similar al que se definió en el estudio el anti-RNPC3 se detectó por IP. Por lo tanto, la técnica de PMAT puede ser útil para determinar anti-RNPC3 en la práctica clínica diaria.

Podemos concluir que el anti-RNAP III y el anti-RNPC3 son anticuerpos poco prevalentes pero con gran trascendencia clínica ya que predicen un perfil clínico determinado, y su expresión puede ayudarnos en el seguimiento y tratamiento de los pacientes.

## SUMMARY

Systemic Sclerosis (SSc) is an autoimmune disease in which the expression of specific antibodies has important clinical and prognostic implications. Antibodies are useful for predicting the clinical features of the disease, and the expression of each of them confers a different prognosis. The most prevalent antibodies in SSc are well studied due to the availability of detection techniques. However, some specific antibodies are less prevalent and less studied, but are associated with serious organic disease.

The objective of this study was to determine the prevalence, clinical associations and survival of two antibodies with low prevalence in SSc: anti-RNA polymerase III (anti-RNAP III) and anti-RNPC3 (or anti-U11/U12).

In the first study, 221 SSc patients were selected. Patients with positivity for anti-RNAP III were compared with anti-RNAP III negative patients. A prevalence of 11.8% was found. Patients who expressed anti-RNAP III had higher frequency of diffuse cutaneous SSc, arthritis, scleroderma renal crisis (SRC) and arterial hypertension. However, we have not found any association with cancer or gastric antral vascular ectasia. Regarding survival, there were no differences in the Kaplan Meier curves between both groups. The independent risk factors associated with a worse prognosis in the anti-RNAP III cohort were SRC, interstitial lung disease (ILD) with FVC < 50% and pulmonary arterial hypertension (PAH).

In the second study, 447 SSc patients were selected from two different sites (Barcelona n=286 and Milan n=161), and anti-RNPC3+ patients were compared with negative patients. The prevalence found was 4.3%. Anti-RNPC3+ patients had a higher frequency of ILD, severe ILD terminal lung disease and worse survival. No association with cancer or gastrointestinal disease was observed. The independent risk factors

associated with worse survival were age and the presence of PAH. The independent risk factors associated with worse prognosis (death and/or severe events) were the presence of anti-RNPC3, diffuse cutaneous subtype, age at onset, ILD, PAH and the expression of anti-topoisomerase I (ATA). Compared to ATA patients, anti-RNPC3 patients exhibited a shorter time to event free survival. The clinical phenotype described in anti-RNPC3+ patients determined by PMAT is similar to that defined in the study in which anti-RNPC3 was detected by immunoprecipitation. Therefore, the PMAT technique can be useful to determine anti-RNPC3 in daily clinical practice.

We can conclude that anti-RNAP III and anti-RNPC3 are low prevalent antibodies that have great clinical significance since they predict specific profile, and their expression can help us in the monitoring and treatment of patients.

# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 Historia

La palabra “esclerodermia” proviene de los términos griegos *skleros* (duro) y *dermis* (piel), por lo que significa “piel dura”. Se conocen evidencias que nos orientan hacia la existencia de la enfermedad desde épocas muy antiguas. Ya Hipócrates (460-370 a.C) en sus “*Traités épidemiés*” describe un ateniense cuya piel estaba tan indurada que no se podía pellizcar. Sin embargo, no fue hasta el renacimiento cuando Diemberbroeck (1637) realiza la primera descripción sólida al respecto <sup>1</sup>. La primera vez que se utilizó el término “esclerodermia” fue en 1836 por Fantonetti <sup>2</sup>.

## 1.2 Conceptos Generales

La esclerodermia sistémica o esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad autoinmune multisistémica que se fundamenta en tres pilares básicos: una alteración de la microcirculación, la activación del sistema inmune y un depósito excesivo de colágeno en piel y órganos internos <sup>3</sup>.

La alteración de la microcirculación es responsable de gran parte de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y puede preceder en años al inicio de la clínica <sup>4</sup>. Dicha alteración se puede apreciar de forma relativamente sencilla en las consultas mediante capilaroscopia periungueal, que identifica alteraciones capilares específicas de esclerodermia en periodos subclínicos. Además, dependiendo del patrón capilaroscópico se puede predecir posibles complicaciones de la esclerodermia.

Por otro lado sabemos que en fases preclínicas de la enfermedad y algunas veces muchos años antes del inicio de los síntomas, podemos detectar en suero la presencia de

distintos anticuerpos <sup>5</sup>, siendo algunos altamente específicos para la esclerodermia y sirviéndonos como biomarcador que facilita el diagnóstico temprano de la enfermedad. La presencia de anticuerpos nos confirma la importancia de la autoinmunidad en ES.

Si bien es cierto que no se conoce con exactitud el papel patogénico que juega cada anticuerpo, investigaciones recientes aportan cada vez más evidencia de que muchos de ellos se implican de manera directa en la etiopatogenia de la ES. Además es bien conocida la utilidad de los anticuerpos en la clasificación y diferenciación de los pacientes en diferentes fenotipos clínicos, pudiéndose predecir las distintas manifestaciones orgánicas y por consiguiente el pronóstico <sup>6-9</sup>. A lo largo del texto desarrollaremos de manera más amplia y enfatizaremos en la importancia de la autoinmunidad en la ES.

La ES presenta una mortalidad no menospreciable, superior a la de otras enfermedades autoinmunes sistémicas. Más de la mitad de los pacientes fallecen por una causa relacionada con la enfermedad. Sin embargo, existen datos que nos demuestran que en los últimos años ha mejorado la supervivencia gracias a la aparición de tratamientos más eficaces y a la protocolización de la detección temprana de las complicaciones graves en la ES. En un estudio de *Nithyabnova et al* <sup>10</sup>. del año 2010 se observó que la supervivencia media a los 5 años en el subtipo ES difusa pasó de ser del 69% en 1990-1993 al 84% en 2000-2003 sin constatarse aumento en la supervivencia en el subgrupo ES limitada, falleciendo más de la mitad de los pacientes por una causa relacionada con la enfermedad. Dicho incremento en la supervivencia en el subgrupo ES difusa se atribuyó al mejor conocimiento y al cribaje anual de las complicaciones pulmonares <sup>10</sup>.

La ES también se asocia a un incremento de la discapacidad y peor calidad de



## Introducción

vida medido mediante escalas validadas, aspecto a tener muy en cuenta debido a la edad en la que algunas veces se diagnostican a los pacientes <sup>11,12</sup>.

### **1.3 Etiopatogenia**

Se inicia con el daño endotelial o epitelial por un antígeno externo sobre un huésped susceptible, produciéndose citocinas profibróticas y proinflamatorias por el sistema inmune innato y adaptativo. Además, la inflamación vascular puede producir trombosis *in situ*, proliferación muscular y fibrosis subendotelial dando lugar a las manifestaciones vasculares de la enfermedad <sup>13</sup>.

Por lo tanto, en la etiopatogenia de la ES interviene el sistema inmune, la genética, la vasculopatía, factores ambientales, y el metabolismo celular.

#### **a) Sistema inmune**

Existe una activación del sistema inmune tanto innato como adaptativo <sup>14</sup>. Se han encontrado células T activadas en sangre periférica y tejido cutáneo lesionado en la esclerodermia <sup>15</sup>. Así mismo, niveles aumentados de Th17 son responsables de la activación del fibroblasto a miofibroblasto en células endoteliales y musculares lisas <sup>16</sup>. Existe disminución de las células Th1, que secretan interferón gamma, el cual inhibe la producción de colágeno. Por otro lado se ha constatado incremento de linfocitos T helper 2 (Th2), que son las responsables de la producción de interleuquina (IL) 4, IL-5 e IL-13 favoreciendo la infiltración por monocitos y fibrosis <sup>17</sup>.

Los linfocitos B están hiperactivados, lo que conlleva la producción de diferentes autoanticuerpos en la enfermedad. Es conocido, además que infiltran tejidos y muestran marcadores de activación elevados, como moléculas coestimuladoras, el factor de activación de los linfocitos B, el CD19 y el CD21. Se ha demostrado en modelos animales que la sobreexpresión de CD19 se asocia a aumento de fibrosis cutánea, mientras que la ausencia de células B se ha visto asociada a una menor fibrosis <sup>18</sup>.

## **b) Genética**

Existe cada vez más evidencia de la importancia del estudio genético en la esclerodermia y en su diagnóstico precoz. La sospecha de que cierto grupo de genes confieren mayor susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad parte de observaciones clínicas. Por ejemplo, en una población concreta de Estados Unidos, se detectó una prevalencia de ES veinte veces mayor que en la población general, siendo la mayoría de ellas del mismo perfil clínico (subtipo cutáneo difusa, que expresaban anticuerpos anti-topoisomerasa I (ATAI) y con predominio de afección pulmonar) <sup>19</sup>; posteriormente se identificó que la presencia de ATAI en esta población estaba ligada al antígeno leucocitario humano (HLA) haplotipo DQ7, DR2 (DRB1\*1602).

Distintos genes del sistema HLA están relacionados con la expresión de algunos anticuerpos específicos, como es el caso de algunos alelos HLA-DQB1 con el anticuerpo anti-fibrilarina <sup>20</sup>, HLA-DRB1 y HLA-DQB1 con el ATAI <sup>21</sup>, el HLA-DQB1\*0501 con el anticuerpo anti-centrómero (ACA), el HLA-DRB1-0301 con el anti-PM/Scl <sup>22</sup> o el anti-ácido ribonucleico polimerasa III (RNAP III) con el HLA DQB1-0201 <sup>23</sup>.

En otro estudio del genoma completo de más de 2700 pacientes con ES se identificaron varios locus de susceptibilidad a padecer la enfermedad, como el CD247, el

## Introducción

factor 5 regulador de interferón (*IRF5* en inglés) y el transductor de señal y activador de transcripción 4 (*STAT4* en inglés) <sup>24</sup>.

Conocer la base genética de la enfermedad sería útil para predecir sus manifestaciones clínicas y poder ofrecer una medicina personalizada <sup>25</sup>.

### **c) Vasculopatía**

La vasculopatía es un fenómeno fundamental en la enfermedad, responsable de manifestaciones clínicas frecuentes como el fenómeno de Raynaud (FR), la crisis renal esclerodérmica (CRE), las úlceras digitales (UD), la afección cardíaca y la hipertensión arterial pulmonar (HAP). El daño endotelial, se produce por tres vías: 1) apoptosis de la célula endotelial, que puede dar lugar a la destrucción vascular visualizada en la capilaroscopia; 2) transformación de la célula endotelial en mesenquimal y 3) activación de la célula endotelial, con sobreexpresión de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina 1 (ET-1), la E-selectina, la moléculas de adhesión vascular 1 (VCAM-1), que contribuye al desarrollo de trombosis, fibrosis subepitelial y la proliferación de las capas musculares de los vasos, hallazgo típico en la ES <sup>26</sup>.

La representación clínica más frecuente de la lesión endotelial es el FR, presente en la práctica totalidad de los pacientes y que consiste en una vasoconstricción periférica transitoria producida por fenómenos vasculares, neuronales y humorales <sup>27,28</sup>.

La capilaroscopia es un método no invasivo, económico, relativamente sencillo de llevar a cabo y que aporta información útil en en relación a la vasculopatía de la

esclerodermia. Dichos hallazgos están relacionados con el riesgo de padecer ES en pacientes con FR <sup>29</sup>. Además, forman parte de los últimos criterios clasificatorios American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) 2013 <sup>30</sup>.

*Maricq et al.* <sup>31</sup> fue la primera en describir el patrón capilaroscópico en la ES, comparado con un patrón normal. Propuso dos grandes grupos: el patrón activo (*active* en inglés) con predominio de pérdida capilar y áreas avasculares, y el patrón lento (*slow* en inglés) con presencia sobre todo de dilatación capilar <sup>31</sup>. Sin embargo, en el año 2000 *Cutolo et al.* <sup>32</sup> propone una nueva clasificación en tres diferentes patrones: el temprano (*early* en inglés), con escasas microhemorragias y megacapilares, preservación de la estructura pero sin evidencia de pérdida capilar; el activo (*active* en inglés) donde existe mayor pérdida y microhemorragias, la arquitectura capilar está algo desorganizada y puede haber pérdida capilar, y el tardío (*late* en inglés) con predominio de pérdida capilar y capilares ramificados (que indican neoangiogénesis) y práctica desaparición de los megacapilares y las microhemorragias.

## 1.4 Criterios clasificatorios

En el año 2013 se publican los criterios clasificatorios actuales de la ES

Ítem	Sub-ítem	Puntuación
- Engrosamiento de la piel de los dedos de ambas manos proximal a articulación MCF		9
- Engrosamiento de la piel de los dedos (sólo se cuenta la puntuación más alta)	- <i>Puffy</i> fingers (“dedos en salchicha”) - Esclerodactilia (engrosamiento distal a MCF pero proximal a IFP)	2 4
- Lesiones en las puntas de los dedos (sólo se cuenta la puntuación más alta)	- Úlceras digitales (distal a IFP) - <i>Pitting</i> (o “mordedura de rata”)	2 3

## Introducción

- Telangiectasias	2
- Alteraciones capilaroscópicas	2
- HAP y/o EPI (la máxima puntuación es 2)	2
- FR	3
- Anticuerpos específicos (ACA, ATAI o anti-RNAP III) (la máxima puntuación es 3)	3

**Tabla 1.** MCF: metacarpofarlángica; IFP: interfalángica proximal

## 1.5 Clasificación en Subtipos clínicos

### cutáneos

En el año 1988 *LeRoy* y *Medsger* propusieron clasificar a los pacientes con ES según la extensión cutánea en ES difusa si el endurecimiento es proximal y distal a codos y rodillas, y en ES limitada si la induración es distal a codos y rodillas pudiendo afectar a la cara, o incluso sin esclerosis cutánea (subtipo conocido como ES *sine* esclerodermia)<sup>33</sup>. Esta clasificación ha sido validada en diferentes cohortes y ha sido la más utilizada y referenciada hasta la actualidad

En 2001, *Leroy* y *Medsger* revisaron la clasificación que habían propuesto en 1988 y definieron con el término de ES limitada (posteriormente se sustituyó por el término pre ES o ES inicial para evitar confusión con el subtipo cutáneo limitada) a pacientes afectados de FR, anticuerpos específicos positivos y/o patrón capilaroscópico típico de ES<sup>34</sup>. Unos años más tarde, *Koenig et al.*<sup>35</sup> comprobaron que de los sujetos que presentaban FR y alteraciones capilaroscópicas o ANA positivos un 25% y un 35% respectivamente terminaban desarrollando una ES definida, siendo este porcentaje del 80% cuando estaban presentes ambas alteraciones.

En 2011, *Valentini et al.*<sup>36</sup> observaron que realizando pruebas diagnósticas sencillas como un ecocardiograma, unas pruebas de función respiratoria (PFR) y una manometría esofágica a pacientes que cumplían criterios de pre ES hasta un 42% presentaban hallazgos patológicos subclínicos. Por lo tanto, existe un número importante de pacientes que no tienen esclerosis cutánea ni tampoco cumplen criterios de esclerodermia *sine* esclerodermia (definida por FR o equivalente, hallazgos serológicos y capilaroscópicos típicos y afección orgánica típica sin endurecimiento cutáneo) pero que ya tienen afección orgánica inicial, de manera que se clasifican como Pre ES o ES inicial. Los dos términos Pre ES o ES inicial se utilizaron indistintamente hasta que en el 2013 se definieron los criterios actuales de clasificación de ES que solamente debían cumplir los pacientes con ES establecida. Sin embargo, en la cohorte del RESCLE<sup>37</sup> hasta un 15% de los pacientes catalogados de pre ES podían cumplir los criterios definidos. Por este motivo en el 2017 *Trapiella et al.* 8.3%<sup>38</sup>, en un estudio realizado con el registro RESCLE, reclasificaron los pacientes catalogados de pre ES en 2 subtipos: pre ES definida por FR y ANA específicos de ES o con patrón de IFI nucleolar o alteraciones capilaroscópicas compatibles con ES y ES inicial cumplen criterios de pre-ES y además presenta afección esofágica incipiente (EEI hipotenso), descenso de la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO) sin EPI o HAP, disfunción diastólica de VI en el ecocardiograma o manifestaciones musculoesqueléticas como UD, telangiectasias, calcinosis o artritis. Además se observó que el 28% de los pacientes clasificados como ES inicial evolucionaban a ES definida, siendo el porcentaje significativamente mayor que los pacientes catalogados como pre-ES, ya que éstos tan solo evolucionaban hasta cumplir criterios de ES definida en un 8.3%<sup>38</sup>. La clasificación propuesta en este trabajo fue considerada la más apropiada en el artículo de revisión del Profesor Matucci Cerinic

<sup>39</sup>.

## Introducción

Por lo tanto, se define como pre-ES, a los pacientes que presentan FR y ANA específicos de ES o con patrón nucleolar o alteraciones capilaroscópicas compatibles con ES; ES inicial si además de cumplir criterios de pre-ES presenta afección esofágica incipiente, descenso de la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO) sin EPI o HAP, disfunción diastólica de VI en el ecocardiograma o manifestaciones musculoesqueléticas como UD, telangiectasias, calcinosis o artritis. El grupo con ES inicial puede cumplir en un porcentaje de alrededor del 15% los criterios de clasificación ACR/EULAR de ES mientras que el grupo con pre-ES no pueden cumplir los criterios. Por último, se define como ES definida o establecida a los grupos subtipo cutáneo difusa, limitada y a la *sine* esclerodermia <sup>39</sup>.

## **1.6 Manifestaciones clínicas**

Las manifestaciones clínicas son diversas, e importantes de cara al diagnóstico y clasificación de la enfermedad.

La clínica derivada de la afección cutánea (prurito, despigmentación, aunque puede producir gran morbilidad, no se asocia a aumento de la mortalidad <sup>40,41</sup>. Sin embargo, la enfermedad cutánea rápidamente progresiva y con extensión importante, es un factor asociado a aumento de la mortalidad y a mayor afección orgánica <sup>42</sup>.

La afección musculoesquelética se puede manifestar con clínica de artralgias, poliartritis (artritis reumatoide-like), roces tendinosos, calcinosis y contracturas articulares <sup>43</sup>.

La afección pulmonar en forma de EPI está presente en el 80% de los pacientes con ES, pero solo el 25-30% desarrolla enfermedad pulmonar progresiva <sup>44</sup>. Es una manifestación temprana de la ES, apareciendo en los primeros 5 años del inicio de la enfermedad y se estabiliza a los 4-6 años del inicio de la ES, por lo que es necesario un cribaje exhaustivo inicial, mediante TC al inicio y PFRs periódicas <sup>44-46</sup>.

La HAP afecta al 15% de los pacientes con ES <sup>47</sup>. Al contrario que otras manifestaciones de órganos internos que son más frecuentes en el subtipo cutáneo difusa, la HAP es más frecuente en el subtipo cutáneo limitada. Debido a que la HAP es una afección orgánica potencialmente letal, el cribaje y detección precoz han mejorado su pronóstico. Si bien el ecocardiograma transtorácico se utiliza para el cribaje de la HAP, la regurgitación tricuspídea puede estar ausente en un 15-20% de los pacientes. El algoritmo DETECT incorpora parámetros clínicos, de laboratorio, las PFR y el ecocardiograma para la detección precoz de la HAP.

La afección del aparato gastrointestinal es prácticamente universal en la ES, aunque su gravedad es variable <sup>48</sup>. La afección del aparato digestivo alto es frecuente <sup>49</sup>. La clínica gastrointestinal en la ES consiste en reflujo gastroesofágico, estreñimiento, diarrea e incontinencia anorrectal. Además, puede existir GAVE y causar anemia silente; el GAVE se ha asociado a anti-RNAP III en varios estudios <sup>48</sup>.

La CRE se define por el desarrollo de microangiopatía trombótica (MAT), con una fase acelerada de hipertensión e insuficiencia renal aguda; sin embargo, hay que tener en cuenta que, algunos casos son normotensivos y predomina la MAT. <sup>50</sup>. La positividad de anti-RNAP III es un factor de riesgo de presentar CRE, ya que un 25% de los casos



## Introducción

positivos desarrollarán CRE. Sin embargo, la frecuencia de CRE está disminuyendo los últimos años, esta disminución pudiera reflejar el aumento en la detección de subtipos con menor riesgo, como la ES cutánea limitada<sup>51</sup> y también la instauración más precoz e intenso de tratamiento vasodilatador

La afección cardíaca en la ES está probablemente infraestimada<sup>52</sup>. Los pacientes pueden debutar de manera brusca con insuficiencia cardíaca grave, sin haber sido previamente reconocida. La enfermedad cardíaca oculta, podría contribuir a la muerte súbita en algunos pacientes con ES<sup>53</sup>. El realce de gadolinio objetivado por RM es un hallazgo que confirma fibrosis cardíaca focal o difusa; sin embargo, si la fibrosis es menos evidente podría no observarse.

## **1.7 Supervivencia y factores pronósticos.**

La supervivencia en la ES ha mejorado en los últimos años debido al diagnóstico más temprano de la enfermedad y a las nuevas herramientas de tratamiento, pasando de ser la supervivencia acumulada a los 10 años de un 54% en la década de los 60 hasta un 66% en la década de los 90, según un estudio realizado en la cohorte de Pittsburg<sup>54</sup>. En esta cohorte se describió un cambio en las causas de muerte, pasando de ser la primera causa de muerte la CRE a la afección pulmonar (EPI o HAP) en la actualidad. En esta misma línea, en un estudio de las causas de muerte, supervivencia y factores pronósticos del registro RESCLE en el que se incluyeron 879 pacientes, el 55% de las muertes ocurrieron por causas atribuidas a la ES siendo la HAP la principal causa (16.6%). Se identificaron como factores pronósticos independientes el subtipo cutáneo difusa, la edad al inicio de la enfermedad, la CRE, la EPI y la HAP<sup>55</sup>.

En un metaanálisis francés reciente, *Pokeerbux et al.*<sup>56</sup> sitúan la supervivencia global a los 5 años en 85.9%. Sin embargo, existe amplia variación en la misma según la diferente metodología de los trabajos, fundamentalmente porque algunos autores consideran el inicio de la enfermedad como la fecha de inicio del FR y otros consideran el inicio de la misma como la fecha a la que empieza la primera manifestación clínica distinta al FR. *Rubio et al.*<sup>57</sup> en un metaanálisis donde se revisan 43 estudios con más de 13.500 pacientes, observan una supervivencia acumulada estimada desde el FR del 87.6% a los 5 años y del 74.2% a los 10 años, mientras que desde el primer síntoma diferente al FR del 84.1% a los 5 años y del 75.5% a los 10 años. Sin embargo, no sólo las diferencias metodológicas justifican la diferente supervivencia entre series, sino que también influye la proporción distinta de los diferentes subtipos cutáneos. De esta manera, en un trabajo del registro RESCLE las supervivencias a los 5, 10, 20 y 30 años en los subtipos cutáneos ES limitada y difusa fueron 97%, 95%, 85%, 81% y 91%, 86%, 64% y 39%, respectivamente<sup>58</sup>.

Por último, las diferencias en la supervivencia acumulada en las distintas cohortes también puede justificarse por la diferente prevalencia de factores asociados a peor pronóstico, entre los que se encuentran además del subtipo cutáneo difusa, las afecciones viscerales graves pulmonar (EPI y HAP), cardíaca y renal, el sexo masculino, la edad avanzada en el momento del diagnóstico y la presencia de ATAI<sup>55-57,59</sup>.

En el metaanálisis francés previamente mencionado con más de 11.700 pacientes, se identificaron como factores asociados a peor pronóstico la edad al inicio, el sexo masculino, el origen africano, el subtipo cutáneo difusa, la presencia de ATAI, la afección

cardiaca, renal, la EPI, la HAP y la presencia de cáncer <sup>56</sup>.

## 1.8 Tratamiento

En 2017 los grupos EULAR/EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) y BSR/BHPR (British Society of Rheumatology/British Health Professionals in Rheumatology) realizaron recomendaciones en relación al tratamiento basadas en evidencia clínica, si bien algunas de ellas han variado estos últimos tiempos <sup>60</sup> (*ver tabla*).

<u>Afección orgánica</u>	<b>Recomendación EULAR/EUSTAR</b>	<b>Recomendación BSPR/BHPR</b>
<b>Fenómeno de Raynaud</b>	Calcio-antagonistas dihidropirimidínicos Prostanoides Inhibidores PDE5 Fluoxetina	Educación (evitar frío, cesar consumo de tabaco) Calcio-antagonistas y ARAII Prostanoides Inhibidores PDE5 Simpatectomía palmar
<b>Úlceras digitales</b>	Iloprost ev Inhibidores PDE5 Bosentan	Vasodilatadores orales, analgesia y tratamiento de la infección Prostanoides iv Inhibidores PDE5 AREs Simpatectomía palmar
<b>Hipertensión arterial pulmonar</b>	ERA Inhibidor PDE5 Prostanoides iv Riociguat	Diagnóstico correcto con cateterismo derecho ERA Inhibidor PDE5 Prostanoides iv Riociguat Diuréticos y oxígeno si indicado
<b>Endurecimiento cutáneo</b>	Metotrexate Trasplante de células madre autólogo	Metotrexate, micofenolato, ciclofosfamida, esteroides orales o rituximab Ciclofosfamida, azatioprina o micofenolato de mantenimiento Hidratación (lanolina) Antihistamínicos Tratamiento de las telangiectasias
<b>Enfermedad pulmonar intersticial</b>	Ciclofosfamida Trasplante de células madre autólogo	Ciclofosfamida Micofenolato

		Ciclofosfamida, azatioprina o micofenolato para mantenimiento
<b>Crisis renal esclerodérmica</b>	IECA Monitorización de la presión arterial y función renal en pacientes con esteroides	Identificar pacientes de riesgo y monitorización de la presión arterial IECA Otros antihipertensivos para casos refractarios
<b>Gastrointestinal</b>	IBP Procinéticos Antibióticos rotatorios	IBP Antihistamínicos H2 Procinéticos Nutrición parenteral si indicado Antibióticos rotatorios Laxantes y antidiarreicos si indicado
<b>Cardiaca</b>		<u>IC sistólica:</u> Inmunosupresión Marcapasos, DAI IECA, carvedilol Betabloqueantes con precaución <u>IC diastólica:</u> Diuréticos Calcioantagonistas
<b>Calcionosis</b>		Antibióticos si sobreinfección Fármacos: Hidróxido de aluminio, calcioantagonistas, bifosfonatos, colchicina, inmunoglobulinas, infliximab, minociclina, rituximab y Warfarina Intervenciones: inyección de esteroides, tratamiento con láser y litotripsia Cirugía en casos graves
<b>Musculoesquelética</b>		Inmunosupresores Artritis y miositis según protocolo

## 1.9 Autoinmunidad en la esclerodermia

### 1.9.1 Importancia de la autoinmunidad

Los ANA son un pilar fundamental en desarrollo de la enfermedad, ya que cada vez existe más evidencia de su potencial patógeno y de su aparición en fases tempranas

## Introducción

de la ES. En torno a un 95% de los pacientes con ES expresan anticuerpos, algunos muy específicos de la enfermedad. Son importantes también en relación a la afección orgánica, debido a que los distintos anticuerpos específicos se asocian a diferentes afecciones clínicas. Además, el perfil serológico identifica subgrupos de pacientes con diferente progresión de la enfermedad, siendo útil en el diagnóstico y clasificación de la ES. Los anticuerpos también tienen implicaciones en el tratamiento, ya que identifican grupos de pacientes en riesgo de desarrollar manifestaciones clínicas al administrarle determinados fármacos, como ocurre en los pacientes que son anti-RNAP III positivos, que teniendo más riesgo de enfermedad articular inflamatoria, puede desencadenarse una CRE al administrarse glucocorticoides <sup>61</sup>. Concomitantemente, tienen repercusión en el seguimiento de la ES, ya que las pruebas solicitadas y el intervalo entre ellas se adecuarán en parte al anticuerpo expresado.

Existe algunos hallazgos que apoyan el hecho de que los anticuerpos presentan un papel importante en la patogenia de la enfermedad <sup>62</sup>:

- Son altamente específicos y no suelen presentarse en otras conectivopatías.
- Existen diferentes fenotipos clínicos y pronósticos según el anticuerpo expresado.
- En fases tempranas de la enfermedad se encuentran a títulos altos, lo que puede indicar que participen en el proceso inicial.
- En estudios de investigación básica se ha observado que los ATAI circulante inducen un fenotipo proinflamatorio en los fibroblastos, uniéndose e internalizándose en los mismos. De esta manera, el fibroblasto contribuye a la inflamación que precede y acompaña a la fibrosis, aumentando la producción de matriz extracelular (MEC) vía IL-6 <sup>63</sup>.
- Los títulos del ATAI <sup>64</sup> se han relacionado con la gravedad de la enfermedad.

- En el caso del anti-RNPC3, los pacientes con afección gastrointestinal grave presentan con más frecuencia positividad para el anticuerpo que los pacientes con clínica más leve <sup>65</sup>
- El anti-proteína 16 inducible por interferón gamma 16 (IFI 16) se relaciona con la presencia de afección vascular periférica, siendo ésta más grave cuanto más altos son los niveles de anticuerpos. Además, los niveles disminuyen a partir de los 6 meses previos o posteriores a la manifestación clínica <sup>66</sup>.

Se han descrito anticuerpos con potencial patogénico en la iniciación y progresión de la fibrosis y vasculopatía, llamados “anticuerpos funcionales”, la mayoría sin aplicabilidad clínica hasta el momento <sup>67,68</sup> por la dificultad de determinarlos. Algunos ejemplos son:

- **Anticuerpos anti células endoteliales.** Pueden producir activación y apoptosis de la célula endotelial así como estímulo proinflamatorio y profibrótico con liberación de citoquinas, lo que conlleva daño endotelial y activación del fibroblasto. Se han asociado con manifestaciones clínicas vasculares, perivasculares y vasculares pulmonares graves <sup>69</sup>, así como presencia de EPI <sup>70</sup>, hipotetizándose que el remodelado vascular inducido por estos anticuerpos pudiera ser previo al desarrollo de fibrosis pulmonar y contribuir a la misma <sup>71</sup>.
- **Anticuerpos anti fibroblasto.** Inducen un fenotipo proinflamatorio en el fibroblasto, por expresión del ICAM-1 y la producción de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 <sup>72</sup>. También se han relacionado con la presencia de EPI y la positividad de ATAI <sup>73</sup>

## Introducción

- **Anticuerpos anti fibrilina-1.** Se ha objetivado que pueden activar el fibroblasto de la dermis mediante la liberación del factor de crecimiento transformante-beta1 (TGF-  $\beta$ 1) contenido en la MEC <sup>74</sup>.
- **Anticuerpos anti receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).** Estos anticuerpos se han relacionado con la sobreexpresión de genes de colágeno tipo 1 mediante la cascada ROS <sup>75</sup>. Además, se ha descrito que activan las células musculares lisas pudiendo contribuir a la patogenia de la hiperplasia de la íntima vascular, participando en el daño vascular característico de esta enfermedad <sup>76</sup>.
- **Anticuerpos anti MMP-3.** Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son las principales enzimas encargadas de eliminar el excesivo colágeno de la MEC. Los anticuerpos contra estas enzimas se han relacionado con fibrosis en el pulmón, la piel y los vasos renales, sugiriéndose que pudieran jugar un papel patogénico importante en la ES al reducir el recambio del colágeno de la MEC <sup>77</sup>.
- **Anticuerpo anti receptor de angiotensina II tipo 1 y anticuerpo anti receptor de ET-1.** Son anticuerpos funcionales que se han relacionado con mayor riesgo de muerte y de manifestaciones vasculares como la HAP y la CRE.
- **Anticuerpo anti IFI-16.** La regulación de los genes inducidos por interferón se ha descrito en la ES y en otras enfermedades autoinmunes <sup>78</sup>. La IFI-16 es miembro de la familia de genes HIN200, que codifica las fosfoproteínas nucleares IFI16, IFIX, MNDA y AIM-2. Estas proteínas actúan como receptores de reconocimiento de patrones innatos, detectando el DNA bicatenario de los

patógenos invasores. Se ha descrito su asociación con subtipo cutáneo limitada, así como a manifestaciones vasculares graves <sup>66,79</sup>.

## **1.9.2 Métodos de detección**

Existen fundamentalmente cuatro técnicas de laboratorio: la IFI, el inmunoensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la inmunodifusión y el inmunoblot <sup>80</sup> para detectar anticuerpos.

### **a) Inmunofluorescencia indirecta**

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células HEp-2 como técnica de detección de ANAs fue descrita en 1950 <sup>81</sup> y sigue siendo método de cribaje de elección <sup>82</sup>. Es una técnica laboriosa que consiste en diluciones seriadas del suero y determinación visual del patrón de fluorescencia, por lo que está ligada a la subjetividad del que lo interpreta. La población general puede presentar ANA positivos mediante IFI, variando entre 31.7% a una dilución 1:40 al 5% con dilución de 1:160, utilizándose ésta última en muchas ocasiones como el punto de corte en la significación clínica <sup>83</sup>. Se han desarrollado técnicas de lectura automática con las que se consigue una adecuada correlación de lectura comparada con la visual <sup>84</sup>.

Existen diferentes patrones de inmunofluorescencia que se asocian a distintas especificidades antigénicas <sup>85</sup>. Los patrones asociados a ES y sus especificidades son:

- Nuclear homogéneo (AC-29) se relaciona con el ATAI <sup>86</sup>.



## Introducción

- Centromérico (AC-3), que lo presentan anticuerpos anti-centrómero B/anti-centrómero A (anti CENP-B/CENP-A) <sup>87</sup>.
- Moteado fino (AC-4), asociado a anticuerpos anti-Ku, <sup>88</sup>.
- Nucleolar homogéneo (AC-8), relacionado con el anti-Th/To <sup>89</sup> y el anti-PM/Scl <sup>90</sup>.
- Nucleolar grumoso (AC-9), relacionado con anti-U3RNP (anti-fibrilarina), <sup>91,92</sup>.
- Nuclear punteado (AC-10), que se relaciona con el anti-NOR90 y el anti-RNAP III <sup>93,94</sup>.
- Patrón anti- antígeno nuclear de células en ploriferación (PCNA) (AC-13). Sin antigenicidad conocida. No es específico de ES pero puede encontrarse <sup>95</sup>.
- Patrón reticular/miopatía inflamatoria (AC-21) asociado a síndrome de solapamiento entre colangitis biliar primaria y ES <sup>96,97</sup>.
- Patrón centrosoma o centriolo (AC-24) <sup>98</sup>.
- Patrón NuMa-like (AC-26) detectados en ES, aunque también en Síndrome de Sjögren o Lupus Eritematoso Sistémico (LES) <sup>99</sup>.

## **b) Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

La técnica de ELISA se puede utilizar como cribaje de ANAs en centros con gran número de muestras <sup>100</sup> o para la detección de diferentes anticuerpos. Es una técnica rápida y globalmente tiene una sensibilidad entre 77-100% <sup>101</sup>. La clave de la técnica es el anticuerpo que se utilice, ya que marcará la sensibilidad y especificidad de la misma. Existen tres formatos básicos: el ELISA directo, en el que el anticuerpo se conjuga con una enzima, para detectar el antígeno inmovilizado en placa; el indirecto, donde un segundo anticuerpo se utiliza para amplificar la señal del primer anticuerpo unido al antígeno y el ELISA en sándwich, en el que un anticuerpo en una placa inmoviliza el

antígeno y posteriormente un segundo anticuerpo conjugado con enzimas reconoce un epítopo diferente del mismo antígeno <sup>102,103</sup>.

### **c) Inmunodifusión**

Se trata de la difusión en una matriz semi sólida del precipitado formado por la reacción de antígeno y anticuerpo en adecuadas proporciones. Esta técnica está siendo sustituida por ELISA <sup>80</sup>.

### **d) Inmunoblot**

El inmunoblot o *western blot*, es una técnica utilizada con frecuencia durante los últimos años para la detección de anticuerpos específicos de determinadas enfermedades, por su rápida medida y la determinación en una sola técnica de varios anticuerpos <sup>104</sup>. Consta de tres fases, la primera de separación de proteínas por tamaño, la segunda de transferencia a un soporte sólido y una tercera de marcación de proteínas con el uso de anticuerpos apropiados <sup>105</sup>. Dicha técnica nos permite analizar un gran número de anticuerpos específicos de la ES. Disponemos de una técnica comercial (EUROLINE Systemic Sclerosis Profile, Euroimmun, Germany), que permite la detección conjunta del anticuerpo anti-Scl70 o ATAI, anti-centrómero (anti-CENP A y anti-CENP B), anti-RNAP III (anti-RP 11 y anti-RP155), anti-fibrilarina o anti-U3RNP, anti-NOR90, anti-Th/To, anti PM/Scl (anti PM/Scl 75 y anti PM/Scl 100), anti-Ku y anti-PDGFR. Con ello contamos con una útil herramienta diagnóstica en la práctica clínica.

Sin embargo, a pesar de que se determinan hasta 9 anticuerpos por esta técnica, existen algunos que no están incluidos. Por otro lado, es la técnica mejor validada para el anti-RNAP III.

### **e) Tecnología multianalítica basada en partículas (particle-based multi-analyte technology, PMAT).**

La técnica multianalítica basada en partículas (PMAT, *siglas en inglés*), es una nueva técnica desarrollada por el laboratorio Inova en la que los antígenos se acoplan a partículas paramagnéticas, analizándose el resultado de esta unión mediante tecnología de imagen digital.

Cada antígeno se acopla a una partícula diferente. Durante una primera incubación, el suero diluido se añade a una mezcla de partículas, y durante la misma los anticuerpos específicos (si están presentes) se unen a autoantígenos afines. Los anticuerpos no unidos se eliminan mediante una fase de lavado, y seguidamente una fase de incubación en una solución que contiene un anticuerpo secundario conjugado con ficoeritrina. Posteriormente las partículas se transfieren a una cámara donde existen diodos que iluminan las partículas mediante luz de distintos espectros. Un diodo emisor de luz identifica las partículas (y consecuentemente el analito que se detecta) y un segundo diodo determina la magnitud de la señal derivada de la ficoeritrina. Una cámara de alta resolución captura la imagen y detecta la intensidad de fluorescencia.

### **f) Inmunoprecipitación**

La inmunoprecipitación (IP) es la técnica más sensible y específica. Se utiliza para separar proteínas que están unidas a anticuerpos específicos, mientras que la co-IP se utiliza para identificar interacciones proteína-proteína entre la proteína unida al anticuerpo y proteínas adicionales detectadas por inmunoblot. Funciona uniendo anticuerpos a la proteína A. La proteína A es una proteína bacteriana con gran afinidad por los anticuerpos IgG. La proteína A se une a perlas de agarosa. Primero se incuba el

anticuerpo con las perlas de agarosa conjugadas a la proteína A y después se incuba la solución de la proteína muestra (extracto de una línea celular humana) con el complejo anticuerpo-agarosa. Posteriormente se centrifuga la muestra a baja velocidad y el complejo de proteínas-anticuerpo unido a perlas de agarosa formará un gránulo que se podrá separar del sobrenadante <sup>106</sup>.

### **1.9.3 Anticuerpos específicos de esclerodermia: descripción y perfil clínico pronóstico**

#### **a) Anti centrómero**

El ACA se describió en 1980 por *Moroi et al.* <sup>107</sup> Se dirige fundamentalmente frente a tres proteínas centroméricas con un peso molecular de 17kDa (CENP-A), 80kDa (CENP-B) y 140kDa (CENP-C) <sup>108</sup>. Se pueden identificar mediante IFI, ELISA o inmunoblot, estos últimos con una alta sensibilidad y especificidad. Presenta una prevalencia del 30.2% en la ES, pudiendo variar según estudios <sup>7</sup>. En un estudio multicéntrico reciente del registro RESCLE, y de igual manera que en trabajos previos, se ha visto asociado a ES subtipo cutáneo limitada y a ES sine esclerodermia, con un tiempo prolongado entre el inicio de la enfermedad y el diagnóstico, comparado con los pacientes positivos para ATAI o anti-RNAP III. En relación a la afección orgánica, un 10-20% desarrollan HAP a lo largo de su trayectoria de enfermedad. Por otro lado, los pacientes que expresan ACA desarrollan con menos frecuencia de artritis, EPI y EPI grave (definida como EPI con FVC<70%) <sup>109</sup>. Aunque su papel protector hacia la misma está establecido <sup>110,111</sup>, ni en este estudio ni en un trabajo multicéntrico francés reciente se encontró asociación con la mortalidad <sup>56</sup>.

## **b) Anti topoisomerasa I**

El ATAI o anti-Scl 70 describió por primera vez en suero de pacientes de ES como una inmunoglobulina que reaccionaba frente a una proteína de 70kDa en 1979 <sup>112</sup>. Las técnicas de detección más usadas son el ELISA y el inmunoblot en papel, con una alta sensibilidad y especificidad. La prevalencia es variable, situándose en torno al 20% y con una alta especificidad para diagnóstico de ES <sup>113</sup>. Existen estudios que apoyan la evidencia de que el ATAI tiene un papel importante en la patogenia de la enfermedad, ya que se encuentra en estadios precoces de la misma y niveles altos del anticuerpo medidos por ELISA se han asociado a mayor gravedad de la enfermedad <sup>64,114</sup>. No obstante, los mecanismos moleculares y celulares según los cuales tenga influencia patogénica no están demostrados

Clínicamente se asocia a mayor mortalidad y a manifestaciones orgánicas graves como EPI, que suele desarrollarse al inicio de la enfermedad. Es por ello, que especialmente a estos pacientes debe realizarse cribaje estrecho al diagnóstico de la misma con tomografía computarizada (TC) y PFR y posteriormente con PFR cada 6 meses para detectar la afección en fase precoz. El ATAI también se ha asociado a afección musculoesquelética, cardíaca, presencia de proteinuria y al subtipo cutáneo difusa <sup>115</sup>.

## **c) Anti RNA polimerasa III**

El anti-RNAP III se describió por primera vez en 1993 <sup>116</sup>. El RP155 se identificó como el mayor epítipo reconocido por el anti-RNAP III. Existen anticuerpos anti-RNAP I, II y III. Los anti-RNAP II se pueden detectar también en pacientes sin ES <sup>117</sup>. Se pueden determinar mediante ELISA, inmunoblot o IP. La prevalencia oscila dependiendo de grupos étnicos y áreas geográficas: en norteamericanos caucásicos y en el reino unido se sitúa entre 20-25% mientras que en japoneses y franceses en el 5% <sup>118,119</sup>. Se desconoce

el papel patogénico, clínicamente se asocian al subtipo cutáneo difusa, CRE y la presencia de ectasia vascular antral gástrica (GAVE) <sup>109,120,121</sup>. Concomitantemente se ha demostrado su relación con cáncer y se ha visto relacionado el inicio de la enfermedad en pacientes que expresan anti-RNAP III con la presencia de cáncer sincrónico (cáncer que se diagnostica en torno a 3 años del comienzo de la ES) <sup>121,122</sup>.

#### **d) Anti-PM/Scl**

En anticuerpo anti-PM/Scl se describió en 1977 por *Wolfe et al.* <sup>123</sup> en pacientes con síndrome de solapamiento polimiositis/ES. El complejo PM/Scl se compone de múltiples unidades de la cuales las moléculas de 75 y 100kDa son las más antigénicas. Se pueden determinar mediante ELISA utilizando el péptido PM-1 alfa o el antígeno humano recombinante PM/Scl 100; también mediante IP o inmunoblot. Clínicamente se asocian a menor edad al inicio de la enfermedad, mayor afección musculoesquelética, así como mayor presencia de artritis inflamatoria y de calcinosis <sup>124</sup>. Aunque se ha relacionado con más frecuencia de afección pulmonar en forma de EPI, ésta es de menor gravedad, presentando los pacientes mejor pronóstico global cuando se comparan por un lado con pacientes que son anti-PM/Scl negativos y también cuando son comparados con enfermos que expresan ATAI <sup>125,126</sup>. El anti-PM/Scl se ha asociado también a cáncer <sup>127</sup>.

#### **e) Anti-fibrilarina**

El anti-fibrilarina o anti-U3RNP (U3-ribonucleoproteína) se detecta por primera vez en 1985 mediante IP, como anticuerpos que precipitaron la U3 ribonucleoproteína, de 34kDa <sup>128</sup>. Se pueden detectar mediante IP o inmunoblot, presentando en la IFI un patrón nucleolar, igual que el anti-PM/Scl y el anti-Th/To. En Estados Unidos se ha objetivado una prevalencia del 4-10% <sup>7,129,130</sup>. En cuanto a la clínica, se asocian a afección

## Introducción

muscular, a desarrollo de HAP<sup>47,129,131</sup> y a afección intestinal en forma de cuadros pseudoobstructivos y malabsorción<sup>132</sup>.

### **f) Anti-Th/To**

El anti-Th/To se describió por primera vez en 1982 como un anticuerpo anti nucleolar que precipita las ribonucleoproteínas (RNP) asociadas con los RNA H1/8-2 y Th/7-2, que son componentes de las enzimas RNAsa P y RNAsa MRP respectivamente, cuya función es procesar el RNA<sup>133,134</sup>. El mejor método para determinarlos es la IP, aunque también se pueden detectar por inmunoblot o PMAT. Se encuentra en la ES en un 2-5%, y se ha relacionado con menor duración del FR, afección pulmonar en forma de EPI o hipertensión arterial pulmonar y miositis inflamatoria, siendo la supervivencia acumulada menor que la que presentan otros anticuerpos<sup>7,135</sup>

### **g) Anti-Ku**

El anticuerpo anti-Ku fue descrito por primera vez en 1994<sup>136</sup>. El antígeno Ku es una proteína de unión al DNA implicada en procesos de reparación del DNA, actualmente considerado con un heterodímero de subunidades de 70 y 80 kD<sup>137</sup>. La determinación se puede realizar mediante inmunoblot, inmunoensayo en línea y contraelectroforesis<sup>138</sup>. La prevalencia de anti-Ku en la ES es de en torno un 2%, y se asocia sobre todo a afección musculoesquelética como miositis o artritis y a EPI<sup>139,140</sup>. No son anticuerpos exclusivos de ES, sino que también los pueden expresar pacientes con LES o miopatías inflamatorias<sup>141,142</sup>.

### **h) Anti-U1 RNP**

El anticuerpo anti-U1-RNP se describió mediante doble inmunodifusión en asociación con anti-Sm en 1984<sup>143</sup>. Están dirigidos contra tres proteínas (llamadas 70 kDa, A y C) implicadas en el *splicing* del RNA premensajero<sup>144</sup>. Se encuentra asociado a niveles elevados de ANAs observándose un patrón moteado puro en la IFI, pudiéndose determinar además por inmunoblot<sup>128</sup>. Se expresa en un 5% de los pacientes con ES<sup>145</sup>. Clínicamente se relaciona con el subtipo cutáneo limitada, afección articular y la presencia de HAP<sup>7</sup>. Asimismo, teniendo en cuenta el conjunto de las conectivopatías, se detecta en un 11% de los pacientes que presentan HAP.

### **i) Anti-NOR90/hUBF**

El anticuerpo anti-Nor 90 se describió 1987<sup>146</sup>. El antígeno del anti-NOR90 es el *human upstream binding factor (hUBF)*, que consiste en un doblete de polipéptidos implicados en la transcripción de RNA polimerasa 1<sup>147</sup>. En la IFI se observa patrón nucleolar<sup>80</sup>, pudiéndose detectar por inmunoblot.. La prevalencia es del 6.9%, no siendo específico de ES sino que se ha descrito en otras enfermedades autoinmunes<sup>93,148</sup>. En ES se asocia clínicamente a subtipo cutáneo limitada y a pronóstico favorable<sup>149</sup>.

### **j) Anti-U11/U12**

El anti-U11/U12 o anti-RNPC3 se describió por primera vez en una paciente con ES subtipo cutáneo difusa en 1993 por *Gilliam et al.*<sup>150</sup>. llamados así debido al antígeno dominante de 65kDa del complejo U11/U12, al que van dirigidos. Se puede detectar por IP o por PMAT, encontrándose con una frecuencia del 4-5% en la ES<sup>65,151</sup>. Clínicamente se relaciona con manifestaciones clínicas graves, como EPI o afección gastrointestinal y la presencia de cáncer sincrónico<sup>65,151,152</sup>.



### **k) Anti-RuvBL1/2**

El anticuerpo anti-RuvBL fue descrito en el año 2014. Van dirigidos contra un hexámero localizado en el nucleoplasma, consistente en RuvBL1 y RuvBL2, implicado en numerosos procesos celulares como la reparación del DNA, la transcripción o el remodelado de cromatina <sup>153</sup>. Produce un patrón moteado nuclear en la IFI, habiéndose identificado también en pacientes ANA negativos. Se puede detectar por IP <sup>153,154</sup>. Tiene una prevalencia del 1.7% y se asocia a afección musculoesquelética y a subtipo cutáneo difusa <sup>155</sup>.

### **l) Anti-eIF2B**

Recientemente se ha descrito el anticuerpo anti-eIF2B, que se caracteriza por ser ANA negativo, presentando en la IFI un patrón citoplasmático. Van dirigidos contra el factor de iniciación eucariótico 2B, esencial en la iniciación y regulación de la síntesis proteica en células eucariotas <sup>156</sup>. Se puede detectar por IP <sup>157</sup>. Se relaciona con ES difusa en un 89% de los pacientes y presencia de EPI en el 100%. La afección articular es frecuente y se ha descrito su asociación con artritis reumatoide <sup>154,157</sup>.

## **2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**



La esclerodermia es una enfermedad autoinmune del tejido conectivo caracterizada por fibrosis de la piel y órganos internos, activación del sistema inmune y daño micro y macrovascular, así como estrés oxidativo <sup>3,158</sup>. Investigaciones recientes indican que el sistema inmune juega un papel fundamental en la patogenia <sup>159,160</sup>. Un aspecto importante, es que la gran mayoría de los pacientes tienen ANAs positivos. Además, la reacción de los ANAs contra diferentes componentes intracelulares tiene importancia en la transcripción, *splicing*, y división celular, conllevando la expresión de anticuerpos específicos <sup>6</sup>. Los criterios clasificatorios más recientes, del ACR/EULAR 2013 incluyen los anticuerpos ACA, ATAI y anti-RNAP III <sup>30</sup>. Los ACA están asociados con el subtipo cutáneo limitada, HAP y mejor pronóstico que los pacientes con otros anticuerpos específicos <sup>7,161,162</sup>. El ATAI se relaciona con enfermedad cutánea difusa y EPI <sup>161</sup>. El anti-RNAP III se ha relacionado con el subtipo cutáneo difusa, el desarrollo de CRE, la presencia de GAVE <sup>109,116,120,121,161,163</sup> y la presencia concomitante de cáncer <sup>121,122,164</sup>. Por otro lado, diferentes genes se han asociado con la expresión de distintos anticuerpos, pudiéndose definir el perfil clínico del paciente según la expresión de un anticuerpo determinado, lo que viene determinado por distinta expresión génica.

Por lo tanto, según el anticuerpo expresado se puede predecir el curso clínico de la ES. Con esta hipótesis, conocer qué anticuerpo expresa cada paciente y las características clínicas relacionadas, es una herramienta útil para diagnosticar y tratar las manifestaciones graves de la enfermedad, pudiéndose adaptar las diferentes exploraciones complementarias realizadas a cada paciente y predecir el curso clínico que seguirá cada paciente, según el anticuerpo expresado.

**Estudio de investigación 1: Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNA polimerasa III**

En un metaanálisis reciente se estableció una prevalencia global del anti-RNAP III del 11% de pacientes con ES, con gran heterogeneidad debido a factores demográficos y geográficos <sup>165</sup>. Hasta la actualidad pocos estudios se han centrado en el análisis de las características de los pacientes que expresan este anticuerpo en cohortes del sur de Europa <sup>164,166-169</sup>.

La asociación entre CRE y presencia de anti-RNAP III es conocida <sup>7,61,170-172</sup>, describiéndose una prevalencia de CRE en los pacientes que expresan el anticuerpo del 24% <sup>172</sup>. La CRE ocurre en el 5% de los pacientes con ES, estando presente el anti-RNAP III en el 58% de los casos <sup>170</sup>. Clínicamente los hallazgos más frecuentemente observados son la hipertensión arterial en un 78% de los pacientes, encefalopatía hipertensiva en un 58% y microangiopatía trombótica en un 56% <sup>61</sup>.

Un aspecto a tener en cuenta es la asociación del anti-RNAP III con cáncer sincrónico. En el año *Shah et al.* <sup>122</sup>, identificaron que el anti-RNAP III podría estar relacionado con cáncer en una pequeña cohorte de 5 pacientes. Concomitantemente, *Airò et al.* <sup>173</sup>, en el año 2010 describieron una relación similar en un pequeño grupo de pacientes. Estos hallazgos se confirmaron en 2014 por *Moinzadeh et al.* <sup>121</sup>., en una cohorte de más de 2100 pacientes con ES, donde el 7.1% padecieron cáncer. De ellos se observó que el 26.6% de los pacientes fueron positivos para anti-RNAP III.

En escasos estudios también se ha descrito la asociación de anti-RNAP III con el GAVE <sup>173</sup>. En el año 2010 *Ceribelli et al.* <sup>173</sup>, identificaron en una cohorte italiana que

el 25% de los pacientes con ES que expresaban anti-RNAP III presentaban GAVE diagnosticado por fibrogastroscoopia, mientras que 0% de los pacientes con ATAI positivo. Estos hallazgos se confirmaron en un estudio del grupo EUSTAR <sup>174</sup>, en el que se objetivó asociación con la presencia de anti-RNAP III (OR 4.6; 95%CI 1.2-21.1).

Hasta hace unos años era difícil determinar la positividad para anti RNAP III, ya que la única técnica por la que se podía detectar era por IP con los inconvenientes conocidos como la disponibilidad de un laboratorio autorizado, de personal entrenado, el coste y la laboriosidad de la técnica. Sin embargo, en la última década se han desarrollado diferentes métodos de medida para su determinación, entre ellos el ELISA y el inmunoblot en papel. Se trata del anticuerpo menos frecuente de los tres incluidos en los criterios de clasificación (ACA, ATA anti-RNAP III), y sobre el que menos trabajos se han realizado.

Este estudio se realizó con el objetivo de definir las principales características clínico epidemiológicas y el pronóstico de los pacientes que fueron anti-RNAP III positivo y compararlos con los pacientes anti-RNAP III negativos, en una única cohorte de un centro español.

### **Estudio de investigación 2: Prevalencia y Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNPC3**

Los anticuerpos contra la ribonucleoproteína (RNP) se encuentran frecuentemente en la ES, siendo los más comúnmente expresados el anti-U1 RNP y anti-U3 RNP (anti-fibrilarina). Las asociaciones clínicas de estos Ac son bien conocidas ya que se pueden

### Justificación del estudio

determinar en la práctica diaria. Sin embargo, las características clínicas de los pacientes con anticuerpos contra complejo U11/U12 del espliceosoma (o anti-RNPC3) son mucho menos conocidas porque hasta la actualidad no se dispone de una técnica comercializada para su determinación. De hecho, sólo se han podido definir las características clínico epidemiológicas de la cohorte en la que se detectó por primera vez el anticuerpo a través de IP. Presenta una baja prevalencia en la ES (3.2 y 3.8% en trabajos publicados <sup>151,152</sup>), pero con gran trascendencia clínica, ya que se ha descrito asociación con EPI grave, afección gastrointestinal grave y la presencia de cáncer sincrónico <sup>65,151,152</sup>. Por este motivo es fundamental poder realizar estudios con técnicas de fácil realización para así validar las asociaciones.

El propósito de este segundo trabajo fue evaluar la prevalencia, las características clínico epidemiológicas y el pronóstico de los pacientes que expresan el anticuerpo anti-RNPC3 en dos cohortes de pacientes con ES del sur de Europa utilizando la técnica PMAT.

## **3. OBJETIVOS**





**OBJETIVO PRINCIPAL**

- Definir las características clínico epidemiológicas y el pronóstico de los pacientes que presentan anticuerpos específicos infrecuentes en la ES: el anti-RNAP III y el anti-RNPC3.

**OBJETIVOS SECUNDARIOS**

1- Estimar la supervivencia en los pacientes positivos para uno y otro anticuerpo e identificar los factores de riesgo independientes asociados a peor pronóstico en cada uno de los subgrupos.

2- Investigar la asociación con neoplasia de los dos anticuerpos, y la relación temporal entre el inicio de la ES y el diagnóstico de cáncer en ambos subgrupos de pacientes.

3- Definir el curso clínico de la EPI en los pacientes que expresan anti-RNPC3.

4- Describir el fenotipo clínico de los pacientes con anti-RNPC3 determinado por la técnica multianalitica basada en partículas (PMAT) para valorar la aplicabilidad clínica de la nueva técnica.



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



**Estudio de investigación 1: Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNA polimerasa III**

**PACIENTES**

Se seleccionaron 221 pacientes caucásicos (21 hombres y 192 mujeres) diagnosticados de ES que fueron visitados en la Unidad de Esclerodermia en el Hospital Vall d'Hebron desde 1980. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética para Investigación Clínica (PG (AG) 07/2015), y los pacientes incluidos firmaron el consentimiento informado por escrito. Todos los pacientes cumplieron con los criterios de LeRoy y Medsger<sup>34</sup> y 196 (88.6%) cumplieron con los criterios de clasificación ACR/EULAR 2013 de SSc<sup>30</sup>. Doscientos veintiún pacientes fueron analizados consecutivamente. Entre ellos, 26 presentaban positividad anti-RNAP III y fueron comparados con 195 pacientes que no expresaron anti-RNAP III.

La edad al inicio de la enfermedad se consideró la de la primera manifestación clínica relacionada con la enfermedad incluido el FR, referido por el paciente. También incluimos la edad al inicio de la primera característica clínica diferente al FR. El tiempo hasta el diagnóstico se definió como el intervalo desde el primer síntoma de la enfermedad atribuible a la enfermedad, incluyendo FR hasta el momento del diagnóstico.

**MÉTODOS**

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a los subtipos de Leroy y Medsger<sup>175</sup> modificados. Se definieron los siguientes subtipos: ES cutánea limitada si la esclerosis cutánea era distal a codos y rodillas, pudiendo afectar la cara; ES cutáneo difuso si la esclerosis de la piel era proximal y distal a codos y rodillas pudiendo afectar al tronco y

## Material y métodos

ES sin esclerodermia si el paciente presentaba: 1) FR o equivalentes vasculares (lesiones en “mordedura de rata”, alteraciones capilaroscópicas típicas), 2) Presencia de ANA y 3) afección visceral característica de ES (HAP, EPI, CRE, hipomotilidad esofágica o miocardiopatía esclerodérmica) sin esclerosis cutánea.

El patrón capilaroscópico se definió en “temprano”, “activo” y “tardío” según la clasificación de Cutolo <sup>176</sup>.

**Definición de Afecciones viscerales:** **Afección gastrointestinal:** incompetencia del esfínter esofágico inferior (presión < 15mmHg) e hipomotilidad esofágica, gastroparesia, la presencia de GAVE o sobrecrecimiento bacteriano. **Afección hepática:** elevación de enzimas hepáticas sin otra causa que lo justifique, presencia de hepatitis autoinmune o colangitis biliar primaria concomitante <sup>177</sup>. **HAP:** presión arterial pulmonar media (PAPm)  $\geq$  25mmHg en el cateterismo derecho, con una presión capilar pulmonar (PCP)  $\leq$  15 mmHg y resistencias vasculares pulmonares (RVP)  $>$  3 unidades Wood <sup>178</sup>. Se realizó seguimiento de los pacientes para detección precoz de HAP realizando como mínimo anualmente PFR con DCO, ecocardiograma y monitorización clínica <sup>179</sup>. **EPI:** presencia de patrón intersticial en la tomografía computarizada de alta resolución (TCAR). **Afección cardíaca:** afección pericárdica demostrada por ecocardiograma, TC o resonancia magnética nuclear (RMN); anomalías de conducción objetivadas por electrocardiograma; cardiopatía isquémica en ausencia de factores de riesgo vascular (FRCV) clásicos evidenciado por cateterismo izquierdo, RMN o gammagrafía miocárdica; miocardiopatía esclerodermia o fibrosis cardíaca confirmada por RMN; insuficiencia mitral y disfunción diastólica sin FRCV objetivada por ecocardiograma, así como fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI)  $<$ 50% y fracción de eyección del ventrículo derecho  $<$ 40% evidenciada por ecocardiograma o RMN. La **CRE** se definió por el presencia de un rápido deterioro de la función renal en un periodo de tiempo menor

de un mes o por la combinación de hipertensión arterial (HTA) de reciente aparición o agravamiento de HTA moderada-severa (> 160/90mmHg) y manifestaciones clínicas de HTA maligna <sup>55</sup>.

Los datos en relación a la neoplasia se obtuvieron por la historia clínica e informe anatomopatológico.

**Determinación de anticuerpos:** Los ANA fueron determinados por IFI sobre células HEp-2. Los anticuerpos anti-RNAP III fueron detectado por inmunoblot comercial para las proteínas RP155 y RP11 (*EUROLINE Systemic Sclerosis Profile, Euroimmun, Alemania*), o por ELISA (*Quanta Lite RNA Pol III, Inova Diagnostics*). Utilizando el inmunoblot, los resultados positivos se consideraron según los determinados por el fabricante; los resultados dudosos fueron considerados como negativos. En el test ELISA se definió un resultado positivo según al fabricante del kit MBL con un valor de corte > 28 UI / ml.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para variables categóricas se utilizó el test exacto de Fischer o chi-cuadrado, mientras que para variables continuas el utilizado fue el T-Student. La estimación de la supervivencia se realizó mediante curvas de Kaplan-Meier y el test log-rank. En un primer análisis se consideró como fecha de inicio de la enfermedad cualquier síntoma incluyendo el FR y en un segundo análisis también se estimó la supervivencia desde el primer síntoma diferente al FR. Para la definición de los factores pronósticos independientes se seleccionaron las variables que en el análisis univariante presentaban un nivel de significación del 20% y se incluyeron en el modelo de regresión de Cox, para



## Material y métodos

el análisis multivariante. El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS Statistics 20.0 (INC., Chicago, USA). La significación estadística se definió como un p valor menor de 0.05.

### **Estudio de investigación 2: Prevalencia y Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNPC3**

#### **PACIENTES**

Se seleccionaron 447 pacientes con ES de 2 diferentes centros (Barcelona n = 286 y Milán n = 161) que fueron seguidos en la unidad de ES del hospital Vall d'Hebron y en Fondazione IRCCS Ca'Granda Ospedale Maggiore Policlinico. Se establecieron asociaciones clínicas comparando los grupos de pacientes con anti-RNPC3 positivos y anti-RNPC3 negativos. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado, y el estudio fue autorizado por el Comité para la investigación clínica (PG(AG)07/2015). Trescientos noventa y tres pacientes (89.3%) cumplieron los criterios ACR/EULAR 2013<sup>30</sup>.

#### **MÉTODOS**

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a los subtipos de LeRoy y Medsger<sup>175</sup> modificados. Se definieron los siguientes subtipos: ES cutánea limitada si la esclerosis cutánea era distal a codos y rodillas, pudiendo afectar la cara; ES cutáneo difuso si la esclerosis de la piel era proximal y distal a codos y rodillas pudiendo afectar al tronco y ES sin esclerodermia si el paciente presentaba: 1) FR o equivalentes vasculares (lesiones en “mordedura de rata”, alteraciones capilaroscópicas típicas), 2) Presencia de ANA y 3) afección visceral característica de ES (HAP, EPI, CRE, hipomotilidad esofágica o

miocardiopatía esclerodérmica) sin esclerosis cutánea. La edad al inicio de la enfermedad se consideró como la edad del primer síntoma de la enfermedad, incluido FR referido por el paciente. El patrón capilaroscópico se definió en “temprano”, “activo” y “tardío” según la clasificación de Cutolo <sup>176</sup>.

**Definición de Afecciones viscerales:** se definieron como en el trabajo previo.

**Neoplasias:** la presencia de cáncer se recogió de las historias clínicas y se definió cáncer sincrónico si el diagnóstico se realizó a los 3 años del inicio de la enfermedad.

**Definición de progresión de la enfermedad pulmonar:** se definió una variable combinada (enfermedad pulmonar terminal (EPT)) en la que se incluía: necesidad de oxigenoterapia domiciliaria, trasplante pulmonar o una FVC menor del 50% de lo esperado.

**Definición de progresión de la afección cutánea:** si el paciente presentó un aumento de más de 5 unidades en la escala modificada de Rodnan (mRSS) y la progresión en las UD si aparecieron nuevas UD.

**Definición de supervivencia libre de manifestaciones:** tiempo en el que el paciente permanece vivo sin presentar las manifestaciones graves definidas en la variable combinada EPT.

Se estimó la supervivencia global y la supervivencia libre de muerte y de manifestaciones graves en la cohorte general. Además, también se analizó la supervivencia global y la supervivencia libre de muerte y de EPT en los pacientes con afección pulmonar (EPI o HAP) y de la cohorte de los pacientes con EPI. Se comparó la supervivencia global y la supervivencia libre de muerte y de EPT con los pacientes que expresaron ATAI <sup>3</sup>. Dos pacientes fueron positivos para ATAI y anti-RNPC3 y fueron excluidos del análisis.

## Material y métodos

**Determinación de anticuerpos:** Los ANA se detectaron por IFI sobre células HEp-2.

Todas las muestras se analizaron utilizando una nueva tecnología multianalítica basada en partículas (PMAT, uso exclusivo en investigación, Inova Diagnostics, San Diego, EE. UU.). Otros marcadores clásicos de clasificación de ES (ATAI, ACA, anti-RNAP III) se midieron por inmunoblot (EUROLINE Systemic Sclerosis Profile, Euroimmun, Germany) o ELISA.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para las variables categóricas se utilizó el chi-cuadrado o el exacto de Fisher. Para las variables continuas se utilizó el test U de Mann-Whitney. El análisis de supervivencia se estimó mediante curvas de Kaplan-Meier y el test log-rank. Se definió supervivencia libre de manifestaciones como el tiempo en el que el paciente permanece vivo sin presentar las manifestaciones graves definidas en la variable combinada EPT (necesidad de oxigenoterapia, trasplante pulmonar o FVC < 50%). Para el cálculo de la supervivencia libre de manifestaciones se utilizó la fecha de diagnóstico de la enfermedad y la fecha a la que ocurre la manifestación. El modelo de regresión de Cox se utilizó para el estudio de la supervivencia y los factores de riesgo de la supervivencia libre de manifestaciones, y aquellos con un nivel de significación del 20%, se incluyeron en el análisis multivariante. El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS Statistics 20.0 (Inc., Chicago, EE. UU.). La significación estadística se consideró como un valor *p* inferior a 0.05.

## **5. RESULTADOS**



**Estudio de investigación 1: Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNA polimerasa III**

**CARACTERÍSTICAS CLINICO-EPIDEMIOLÓGICAS**

De los 221 pacientes incluidos en el estudio, 26 (11.7%) mostraron reactividad anti-RNAP III. Veinticuatro pacientes fueron positivos por inmunoblot, 22 fueron RP155+/RP11+, uno fue RP155+/RP11- y otro RP155-/RP11+ (éste último fue también positivo por ELISA). Entre estos 24 pacientes diagnosticados por inmunoblot, 4 fueron también positivos por ELISA. Además, 2 pacientes fueron anti-RNAP III positivos únicamente por ELISA, sin haberse testado por inmunoblot. Las principales características demográficas, clínicas, inmunológicas están representadas en la Tabla I.

El sexo femenino fue el más frecuente en ambos grupos (21, 80.8% y 171, 87.7%). La edad media al inicio de la enfermedad fue similar en ambos grupos ( $32.2 \pm 13.9$  años *vs.*  $40.7 \pm 15.7$  años, en el grupo anti-RNAP III positivo y negativo, respectivamente), así como la edad media en el momento del diagnóstico ( $42,4 \pm 15,6$  años *vs.*  $47.4 \pm 15.5$  años) El tiempo entre FR y el diagnóstico en los pacientes que expresaban anti-RNAP III fue menor de manera estadísticamente significativa ( $4.1 \pm 7.3$  años *vs.*  $6.7 \pm 9.2$  años,  $p = 0.005$ ). El subtipo cutáneo difusa fue significativamente más frecuente en el grupo anti-RNAP III (20, 76.9% *vs.* 35, 17,9%,  $p < 0,001$ ). Los pacientes anti-RNAP III cumplieron con mayor frecuencia los criterios clasificatorios ACR/EULAR 2013 <sup>30</sup> (26, 100% *vs.* 170, 87.2%,  $p = 0.051$ ). En relación a los FRCV tradicionales, los pacientes anti-RNAP III presentaron mayor prevalencia de HTA (13, 50% *vs.* 55, 28,2%,  $p = 0,024$ ) sin diferencias en diabetes mellitus (1, 3.8% *vs.* 10, 5.1%) o dislipemia (6, 23.1% *vs.* 41, 21%). El FR se presentó con menos frecuencia como

## Resultados

primera manifestación de la enfermedad en el grupo anti-RNAP III (14, 53.8% vs. 153, 78.5%  $p = 0.006$ ).

Entre las manifestaciones vasculares periféricas. no hubo diferencias en la prevalencia de FR (26, 100% vs. 190, 97.4%), de UD (16, 61.5% vs. 99, 50.8%) o telangiectasias (20, 76.9% vs. 146, 74.9%) (en grupo anti-RNAP III positivo y negativo, respectivamente).

Tampoco se observaron diferencias significativas en la afección gastrointestinal global (23, 88.5% vs. 169, 86.7%, en la cohorte anti-RNAP III positiva y negativa, respectivamente), esofágica (20, 76.9 vs. 161, 82.6%), gástrica (8, 30.8% vs. 33, 16.9%), la presencia de GAVE (2, 7.7% vs 13, 6.7%), intestinal (6, 23.1% vs. 31, 15.9%) o afección hepática (2, 7.7% vs. 15, 7.7).

No se encontraron diferencias en la afección pulmonar en forma de EPI (14, 53.8% vs. 82, 42.1%, en pacientes anti-RNAP III positivo y negativo, respectivamente) o HAP (3, 11.5% vs. 23, 11.8%). Respecto a los resultados de las PFR, no hubo diferencias en el porcentaje de pacientes con FVC por debajo del 70% o 50% del valor esperado (9, 36% vs. 65, 33.5% y 2, 8% vs. 20, 10.3% respectivamente).

No se detectaron diferencias en la afección cardíaca global (19, 73.1% vs. 150, 76.9%, en el grupo anti-RNAP III positivo y negativo, respectivamente).

La CRE fue significativamente más frecuente en pacientes con anti-RNAP III (3, 11.5% vs. 3, 1.5%  $p = 0.023$ , en la cohorte anti-RNAP III positiva y negativa, respectivamente).

Con respecto a la afección musculoesquelética, la artritis (9, 34.6% vs. 35, 17.9%  $p = 0.046$ ), los roces tendinosos (4, 15.4% vs. 1, 0.5%  $p = 0.001$ ) y las contracturas (5, 19.2% frente a 10, 5.1%  $p = 0.02$ ) fueron más frecuentes de manera estadísticamente significativa en el grupo anti-RNAP III, mientras que no se observaron diferencias en la frecuencia de la miositis (0, 0% vs. 13, 6.7%), miopatía no inflamatoria (1, 3.8% vs. 15, 7.7%) y la calcinosis (7, 26.9% vs. 47, 24.1%).

No se detectaron diferencias con respecto al patrón de capilaroscopia. El patrón tardío de Cutolo se observó en 55/209 (26.3%) pacientes (6/23, 26.1% vs. 49/186, 26.3%, en el grupo anti-RNAP III positivo y negativo, respectivamente) <sup>176</sup>. En el estudio de otros autoanticuerpos asociados, no se detectaron ACA en los pacientes con anti-RNAP III mientras que en el grupo sin RNAP el 35.9% presentaban ACA ( $p < 0.001$ ) (Tabla 2).

No se observaron diferencias en la presencia de cáncer entre ambos grupos (4, 15.4% vs. 25, 12.8% en la cohorte anti-RNAP III positiva y negativa, respectivamente), aunque se detectó una tendencia a presentar un mayor desarrollo de neoplasia sincrónica (2, 7.7% frente a 7, 3.6%,  $p = 0.28$ ).



**Tabla I. Características clínicas y demográficas de 221 patients con ES, con y sin reactividad anti-RNAP III**

Características clínicas y demográficas, n (%)	Total 221 (100)	Anti-RNAP III positivo 26 (11.8)	Anti-RNAP III negativo 195 (88.2)	P
Sexo femenino, n (%)	192 (86.9)	21 (80.8)	171 (87.7)	0.350
Subtipos cutáneos (N=221)				
Limitada, n (%)	137 (62)	6 (23.1)	131 (67.2)	<b>&lt;0.001</b>
<i>Sine</i> ES SSc, n (%)	29 (13.1)	0 (0)	29 (14.9)	<b>0.030</b>
Difusa, n (%)	55 (24.9)	20 (76.9)	35 (17.9)	<b>&lt;0.001</b>
Edad al inicio, media ± DE, años	40.5 ± 15.6	38.3 ± 14.0	40.8 ± 15.8	0.580
Edad al inicio del primer síntoma no FR, media ± DE, años	45.3 ± 14.8	41.0 ± 15.5	45.8 ± 14.7	0.223
Edad al diagnóstico de ES, media ± DE, años	46.9 ± 15.6	42.4 ± 15.6	47.4 ± 15.5	0.170
Tiempo desde FR y diagnóstico, media ± DE, años	6.3 ± 9.0	4.11 ± 7.3	6.8 ± 9.2	<b>0.005</b>
Tiempo desde primer síntoma no FR y diagnóstico, media ± DE, años	2.0 ± 5.1	1.4 ± 2.6	2.0 ± 5.4	0.205
Tiempo de seguimiento desde primer síntoma media ± DE, años	18.7 ± 12.1	16.2 ± 10.5	19.1 ± 12.3	0.268
Tiempo de seguimiento desde primer síntoma no FR, media ± DE, años	13.9 ± 9.3	13.4 ± 9.2	14.0 ± 9.4	0.765
Pacientes que cumplen criterios ACR/EULAR 2013, n (%)	196 (88.69)	26 (100)	170 (87.1)	0.051
Patrón tardío de Cutolo, n (%)	55/209 (26.3)	6/23 (26.1)	49/186 (26.3)	0.979
<b>FRCV</b>				
HTA, n (%)	68/221 (30.8)	13/26 (50)	55/195 (28.2)	<b>0.024</b>
Diabetes Mellitus, n (%)	11/221 (5)	1/26 (3.8)	10/195 (5.1)	1.000
Dyslipidemia, n (%)	47/221 (21.3)	6/26 (23.1)	41/195 (21)	0.810
<b>Manifestaciones vasculares periféricas, n (%)</b>	220/221 (99.5)	26/26 (100)	194/195 (99.5)	0.710
FR, n (%)	216/221 (97.7)	26/26 (100)	190/195 (97.4)	1.000
UD, n (%)	115/221 (52)	16/26 (61.5)	99/195 (50.8)	0.302
Telangiectasias, n (%)	166/221 (75.1)	20/26 (76.9)	146/195 (74.9)	0.820
<b>Afección gastrointestinal, n (%)</b>	192/221 (86.9)	23/26 (88.5)	169/195 (86.7)	1.000
Esofágica, n (%)	181/221 (81.9)	20/26 (76.9)	161/195 (82.6)	0.587
Gástrica, n (%)	41/221 (18.8)	8/26 (30.8)	33/195 (16.9)	0.106
GAVE, n (%)	15/112 (13.4)	2/15 (13.3)	13/97 (13.4)	1.000
Intestinal, n (%)	37/221 (16.7)	6/26 (23.1)	31/195 (15.9)	0.400
Hepática, n (%)	17/221 (7.7)	2/26 (7.7)	15/195 (7.7)	0.679
<b>Afección pulmonar (EPI y/o HAP)</b>	109/221 (49.3)	15/26 (57.7)	94/195 (48.2)	0.363
EPI, n (%)	96/221 (43.4)	14/26 (53.8)	82/195 (42.1)	0.505
HAP, n (%)	26/221 (11.8)	3/26 (11.5)	23/195 (11.8)	1.000
FVC < 70%, n (%)	74/221 (33.8)	9/26 (36.0)	65/195 (33.5)	0.804
FVC < 50%, n (%)	22/221 (10.0)	2/26 (8.0)	20/195 (10.3)	1.000
<b>Afección cardíaca, n (%)</b>	169/221 (76.5)	19/26 (73.1)	150/195 (76.9)	0.664
FEVI < 50%, n (%)	7/221 (3.2)	0/26 (0)	7/195 (3.6)	1.000
Pericarditis, n (%)	23/221 (13.1)	5/26 (19.2)	24/195 (12.3)	0.352

Enfermedad coronaria, n (%)	4/221 (1.8)	0/26 (0)	4/195 (2.1)	1.000
Enfermedad coronaria microvascular, n (%)	17/221 (7.7)	3/26 (11.5)	14/195 (7.2)	0.431
Disfunción diastólica VI, n (%)	101/221 (47.4)	11/26 (44)	89/195 (47.9)	0.716
Insuficiencia mitral, n (%)	127/221 (59.6)	14/26 (53.8)	112/195 (60.1)	0.694
Alteraciones de la conducción, n (%)	50/221 (34)	6/26 (35.3)	44/195 (33.8)	0.906
Fibrosis miocárdica, n (%)	4/221 (1.8)	1/26 (3.8)	3/195 (1.5)	0.396
<b>Afección renal</b>				
CRE, n (%)	6/221 (2.7)	3/26 (11.5)	3/195 (1.5)	<b>0.023</b>
<b>Afección musculoesquelética, n (%)</b>	107/221 (48.4)	16/26 (61.5)	91/195 (46.7)	0.150
Artritis, n (%)	44/221 (19.4)	9/26 (34.6)	35/195 (17.9)	0.046
Roces tendinosos, n (%)	5/221 (2.3)	4/26 (15.4)	1/195 (0.5)	<b>0.001</b>
Contracturas, n (%)	15/221 (6.8)	5/26 (19.2)	10/195 (5.1)	<b>0.020</b>
Miositis, n (%)	13/221 (5.9)	0/26 (0)	13/195 (6.7)	0.373
Miopatía no inflamatoria, n (%)	16/221 (7.2)	1/26 (3.8)	15/195 (7.7)	0.701
Calcinosis, n (%)	54/221 (24.4)	7/26 (26.9)	47/195 (24.1)	0.753
<b>Cancer</b>	25/221 (11.3)	4/26 (15.4)	21/195 (10.8)	0.508
<b>Causas de muerte</b>				
Total, n (%)	29/221 (13.1)	4/26 (15.4)	25/195 (12.8)	0.757
Relacionadas con ES:				
EPI o HAP, n (%)	12/29 (41.3)	3/4 (75)	9/25 (36)	0.126
Cardiopatía, n (%)	3/29 (10.3)	0/4 (0)	3/25 (12)	1.000
CRE, n (%)	1/29 (3.4)	0/4 (0)	1/25 (4)	1.000
No relacionadas con ES	13/29 (44.8)	1/4 (25)	12/25 (48)	0.900

P negrita: p < 0.05

**Tabla 2. Características inmunológicas de 221 pacientes con ES con y sin reactividad anti-RNAP III**

	Overall SSc 221 (100)	Anti-RNAP III positive 26 (11.8)	Anti-RNAP III negative 195 (88.2)	P
Anti-nuclear, n (%)	217 (98.2)	26 (100)	191 (97.9)	1.000
Anti-centromero, n (%)	77 (34.8)	0 (0)	77 (39.5)	<b>&lt;0.001</b>
Anti-topoisomerasa, n (%)	49 (22.2)	3 (11.5)	46 (23.6)	0.165
Anti-PM/Scl, n (%)	17 (7.7)	0 (0)	17 (8.7)	0.230
Anti-RNP, n (%)	6 (2.7)	0 (0)	6 (3.1)	1.000
Anti-Ro52, n (%)	61 (27.6)	3 (11.5)	58 (29.7)	0.051
Anti-Ro60, n (%)	24 (10.9)	2 (7.7)	22 (11.3)	0.740
Anti-La, n (%)	6 (2.7)	1 (3.8)	5 (2.6)	0.530

P negrita: p < 0.05

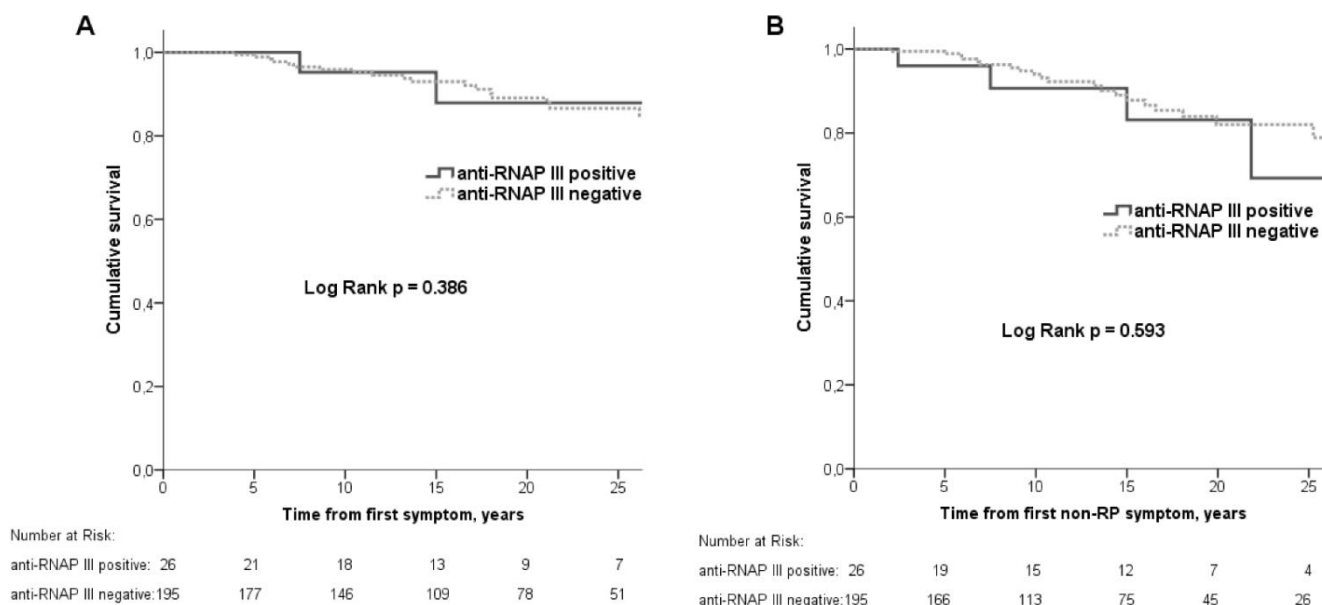
## **MORTALIDAD, CAUSAS DE MUERTE Y SUPERVIVENCIA**

Ambos grupos fueron seguidos una media de  $17.8 \pm 12$  años, no se encontraron diferencias en el porcentaje de mortalidad (4, 15.4% vs. 25, 12.8%, en el grupo anti-RNAP III positivo y negativo, respectivamente), ni en las causas de muerte. Las principales causas de muerte relacionadas con ES fueron la patología pulmonar (EPI o HAP) (3/4, 75% vs. 9/25, 36%), afección cardíaca (0/4, 0% vs. 1/4, 25%) y CRE (0/4, 0% vs. 1/4, 25%). El paciente restante en el grupo anti-RNAP III falleció a causa de cáncer de mama. Las otras causas en el grupo anti-RNAP III negativo fueron las siguientes: 3 neoplasias (gástrica, cáncer de pulmón y leucemia mieloblástica aguda), una neumonía infecciosa, dos por de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, una paquipleuritis crónica, una isquemia intestinal, una cirrosis hepática, accidente cerebrovascular en dos pacientes y una muerte súbita. Los datos de la muerte se obtuvieron de la historia clínica de los pacientes.

No se observaron diferencias significativas en las curvas de supervivencia Kaplan Meier, tanto calculadas desde el inicio de la enfermedad incluido el FR como primera manifestación (log rank  $p = 0.386$ , Fig. 1A), como desde el inicio del primero síntoma no FR (log rank  $p = 0.593$ , Fig. 1B).

Las tasas de supervivencia acumulada desde el FR a los 5, 10, 15, 20 y 25 años en el grupo anti-RNAP III positivo fueron 100%, 95%, 87%, 87% y 87%, respectivamente y en grupo seronegativo fueron 98%, 95%, 93%, 89% y 86%. Las tasas de supervivencia acumulada desde el primer síntoma no FR a los 5, 10, 15, 20 y 25 años en el grupo anti-RNAP III positivo fueron 96%, 90%, 83%, 83% y 69%, respectivamente, y en el grupo seronegativo fue 98%, 93%, 87%, 82% y 82%, respectivamente.

**Figura 1. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier.** El Gráfico A representa la supervivencia acumulativa desde el primer síntoma de ES. El Gráfico B muestra la supervivencia acumulada desde el primer síntoma de ES, excluyendo el FR.



**Definición de factores pronósticos independientes:** En el análisis univariante de Cox se observó que el subtipo cutáneo difusa se asociaba a una peor supervivencia (Hazard ratio (HR): 2.76, IC 95% 1.25 - 6.13), así como la edad en el primer síntoma o al inicio de la enfermedad (Hazard ratio (HR): 1.11, IC 95% 1.07 – 1.14), la edad del primer síntoma diferente al FR (Hazard ratio (HR): 1.05, IC 95% 1.03 – 1.09), la presencia de EPI con un FVC inferior al 50% (HR: 7.06, 95% CI 3.32 - 15.01) y la CRE (HR: 10.47; IC del 95%: 3.09 a 35.43) (tabla III).

**Tabla 3. Análisis univariante y multivariante de supervivencia**

	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Subtipo cutáneo difusa	2.76	(1.25-6.13)	<b>0.012<sup>a</sup></b>	1.36	(0.44-4.22)	0.593
Anti-RNA polimerasa III positivo	1.59	(0.55-4.60)	0.391			
Anti-centromero positivo	0.51	(0.23-1.13)	0.095 <sup>a</sup>	0.94	(0.33-2.66)	0.902
Anti-topoisomerasa	1.73	(0.76-3.91)	0.192 <sup>a</sup>	0.80	(0.27-2.66)	0.679
Varón	1.45	(0.50-4.20)	0.489			
Edad al inicio	1.11	(1.07-1.14)	<b>&lt;0.001</b>			
Edad al primer síntoma no FR	1.05	(1.03-1.09)	<b>&lt;0.001</b>	1.07	(1.04-1.11)	<b>&lt;0.001</b>
EPI con FVC < 50%	7.06	(3.32-15.01)	<b>&lt;0.001<sup>a</sup></b>	8.61	(3.40-21.81)	<b>&lt;0.001</b>
Hipertensión arterial pulmonar	2.12	(0.85-5.27)	0.106 <sup>a</sup>	4.05	(1.42-11.61)	<b>0.001</b>
Crisis renal esclerodérmica	10.47	(3.09-35.43)	<b>&lt;0.001<sup>a</sup></b>	17.27	(3.36-88.97)	<b>0.001</b>
Afección cardíaca	1.12	(0.43-2.95)	0.816			
Cáncer	1.40	(0.54-3.68)	0.490			

P negrita: p < 0.05; RP:

Se seleccionaron variables con una p < 0.20 para realizar la regresión multivariada de Cox. En el estudio multivariante se definieron los siguientes factores independientes asociados a peor pronóstico: la presencia de EPI con un FVC inferior al 50% (HR: 8.61, IC 95% 3.40 - 21.81), la HAP (HR: 4.05, IC 95% 1.42 - 11.61), la CRE (HR: 17.27, IC 95% 3.36 - 88.97) y la edad (Tabla 3). Ninguno de los autoanticuerpos analizados se asoció con peor pronóstico.

**Estudio de investigación 2: Prevalencia y Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNPC3**

**CARACTERÍSTICAS CLINICO-EPIDEMIOLÓGICAS**

En la corte global (n=447), el 4.25% de los pacientes presentaron positividad para anti RNPC3 (n=19). La mayor parte de pacientes expresó ANA en ambos grupos (RNPC3 positivo y negativo), y el patrón más frecuentemente observado por IFI fue el moteado (68.4% moteado, 15.8% nucleolar, 10.5% centromérico y 5.3% homogéneo). La mayoría

de los pacientes que expresaron anti-RNPC3 no expresaron ningún otro anticuerpo específico; solo 5 expresaron anti-RNPC3 y ACA. Las principales características clínico epidemiológicas, inmunológicas el tratamiento utilizado y la asociación con otros anticuerpos se muestran en la tabla 4 al final del apartado.

El sexo femenino fue el más frecuente en ambos grupos (17, 89.5% vs. 392, 91.6%). No hubo diferencias en las prevalencias de subtipo cutáneo difusa (5, 16.3% vs. 73, 17.2%) siendo el subtipo cutáneo limitada el más frecuente en el grupo positivo (63.2% cutáneo limitado y 10.5% *sine* esclerodermia). Tampoco se observaron diferencias en la frecuencia de patrón capilaroscópico “tardío” de Cutolo (3, 30% vs. 58, 22.5%). La afección vascular periférica fue similar en ambos grupos (19, 100% vs. 425, 99.3%), sin diferencias en el FR (18, 94.7% vs. 420, 98.1%), las UD (9, 47.4% vs. 167, 39%) o las telangiectasias (11, 57.9% vs. 327, 76.4%). No hubo diferencias en la afección gastrointestinal global (17, 89.5% vs. 372, 86.9%), ni en la presencia de GAVE (0, 0% vs. 16, 3.7%) o en la afección intestinal (2, 10.5% vs. 62, 14.5%). La afección pulmonar global en forma de EPI o HAP fue más frecuente de manera estadísticamente significativa en el grupo que expresó anti-RNPC3 (13, 68.4% vs. 170, 39.7%,  $p = 0.013$ ) así como específicamente la EPI (11, 57.9% vs. 144, 33.6%,  $p = 0.030$ ). Además, se observó una tendencia a encontrar más HAP en el grupo positivo (5, 26.3% vs. 46, 10.7%,  $p = 0.053$ ).

Los resultados de las PFR fueron similares al inicio y al final del seguimiento en los dos grupos teniendo en cuenta los valores de la mediana de FVC y de la DLCO, pero el porcentaje de pacientes que presentaron  $FVC < 50\%$  del valor esperado en cualquier momento del seguimiento fue significativamente mayor en el grupo anti-RNPC3+ (7, 38% vs. 36, 8.4%,  $p = 0.001$ , OR: 6.35, 95% CI [2.35-7.14]). En el ecocardiograma, la

## Resultados

velocidad de regurgitación tricuspídea al inicio del seguimiento fue mayor en el grupo anti-RNPC3+ (2.5ms/s [2.2-2.7] vs. 2.3m/s [2.1-2.5],  $p = 0.034$ ) sin observarse diferencias en la presión arterial pulmonar sistólica estimada (30.0mmHg [24.5-37.5] vs. 28.0mmHg [24.0-33.0]).

No se observaron diferencias en la presencia de CRE (0, 0% vs. 4, 0.9%), en la afección cardíaca (8, 42.1% vs. 137, 32.0%) ni en la afección musculoesquelética (5, 26.3% vs. 165, 38.6%).

Considerando los tratamientos utilizados, hubo una tendencia a utilizar más tratamiento inmunosupresor en el grupo positivo (13, 68.4% vs. 196, 45.8%,  $p = 0.053$ ), además cuando se excluyen los corticoides, el tratamiento inmunosupresor se utiliza con más frecuencia en la cohorte anti-RNPC3+ alcanzando diferencias estadísticamente significativas de manera global (11, 57.9% vs. 130, 30.4%,  $p = 0.012$ ), y específicamente en el uso de ciclofosfamida (6, 31.6% vs. 44, 10.3%,  $p = 0.013$ ), rituximab (4, 21.1% vs. 20, 4.7%,  $p = 0.014$ ) y micofenolato (4, 21.1% vs. 45, 10.5%,  $p = 0.039$ ). No se encontraron diferencias en el uso de azatioprina (4, 21.1% vs. 45, 10.5%) o metotrexate (2, 10.5% vs. 36, 8.4%). El tratamiento vasodilatador y particularmente los ARE, los inhibidores de PDE5 y los inhibidores de prostaglandinas fueron utilizados de forma similar en ambos grupos

En relación con la presencia de cáncer, no hubo diferencias en la presencia de cáncer de manera global (4, 21% vs. 72, 16.8%) ni en el cáncer sincrónico (0, 0% vs. 16, 3.7%) entre ambos grupos. Los tipos de cáncer en el grupo anti-RNPC3+ fueron cáncer de mama ( $n = 2$ ), melanoma ( $n = 1$ ) y cáncer hematológico ( $n = 1$ ).

El tiempo de seguimiento fue similar en ambos grupos (14.2a [11-20.3] vs. 16.8a [10.8-16.5]), sin diferencias en la mortalidad (2, 10.5% vs. 41, 9.6%), ni en las causas de muerte. Las principales causas de muerte relacionadas con la ES fueron la EPI (0, 0% vs. 2, 0.5%), la HAP (1, 5.3% vs. 6, 1.4%) y la cardiopatía relacionada con la ES (0, 0% vs. 2, 0.5%). Otra causa de muerte no relacionada con la ES fue el cáncer, sin diferencias entre ambos grupos (1, 5.3% vs. 10, 2.3%).

Tanto el porcentaje de pacientes que alcanzaron la EPT como los que presentaron FVC < 50% en cualquier momento, fueron significativamente mayores en el grupo anti-RNPC3+ (7, 36.8% vs. 74, 17.3%,  $p = 0.006$  and 7, 36.8% vs. 36, 8.4%,  $p = 0.001$ , respectivamente). No se observaron diferencias en la necesidad de oxigenoterapia (1, 5.3% vs. 19, 4.4%) o de trasplante pulmonar (1, 5.3% vs. 11, 2.6%) entre ambos grupos. Se encontró una tendencia a presentar más frecuencia de muerte o de manifestaciones adversas (EPT o muerte) en el grupo anti-RNPC3+ (7, 36.8% vs. 74, 17.3%,  $p = 0.059$ ) sin alcanzar la significación estadística. No se encontraron diferencias en la progresión de UD entre ambos grupos (6, 31.6% vs. 92, 21.5%), pero se halló una tendencia a presentar mayor progresión cutánea en el grupo positivo (5, 26.3% vs. 40, 11.4%,  $p = 0.066$ ).



## Resultados

Tabla 4. Características demográficas y clínicas de 286 pacientes de una cohorte española y 161 pacientes de una cohorte italiana, todos afectados de esclerodermia, con y sin reactividad para anti-RNPC3.

Demographic and clinical characteristics, n (%)	Overall SSc (n = 447)	Anti-RNPC3 positive (n = 19)	Anti-RNPC3 negative (n = 428)	Univariate analysis OR (95% CI)	P
Sexo femenino, n (%)	409/447 (91.5%)	17/19 (89.5%)	392/428 (91.6%)	0.78 (0.17 – 3.51)	0.670
<b>Subtipos cutáneos</b>					
Subtipo cutáneo difusa, n (%)	78 (17.6%)	5/19 (26.3%)	73/424 (17.2%)	1.71 (0.60-4.92)	0.350
Edad al inicio de la enfermedad, mediana (IQR)	42.0 (30.5 - 51.2)	40.0 (33.3 – 50.0)	42.0 (30.2 – 51.2)	-	0.682
Edad al diagnóstico, mediana ± SD, a	48.8 (38.7 – 59.48)	43.1 (37.0 – 52.0)	49.0 (38.8 – 59.6)		0.266
Tiempo desde el primer síntoma hasta el diagnóstico, mediana ± SD, a	3.0 (1.0 – 10.0)	2.1 (1.00 – 9.8)	3.0 (1.0 – 10.0)		0.607
Tiempo de seguimiento desde el primero síntoma, media ± SD, a	16.7 (10.9 – 25.4)	14.2 (11.0 – 20.3)	16.8 (10.8 – 26.5)		0.230
Pacientes que cumplen criterios ACR/EULAR de 2013, n (%)	399/447 (89.3%)	17/19 (89.5%)	382/428 (89.3%)	1.04 (0.23 – 4.57)	1.000
Patrón tardío de Cutolo, n (%)	61/268 (22.8%)	3/10 (30.0)	58/258 (22.5%)	1.48 (0.37 – 5.90)	0.700
<b>Manifestaciones vasculares periféricas, n (%)</b>					
Fenómeno de Raynaud, n (%)	444/447 (99.3%)	19/19 (100%)	425/428 (99.3%)	-	1.000
Úlceras digitales, n (%)	438/447 (98%)	18/19 (94.7%)	420/428 (98.1%)	0.34 (0.04 – 2.89)	0.326
Telangiectasias, n (%)	176/447 (39.4%)	9/19 (47.4%)	167/428 (39%)	1.40 (0.56 – 3.53)	0.466
	338/447 (75.6%)	11/19 (57.9%)	327/428 (76.4%)	0.43 (0.17 – 1.06)	0.096
	389/447 (87.0%)	17/19 (89.5%)	372/428 (86.9%)	1.28 (0.29 – 5.69)	1.000
<b>Afección gastrointestinal, n (%)</b>					
Afección esofágica, n (%)	376/447 (84.1%)	17/19 (89.5%)	359/428 (83.9%)	1.63 (0.37 – 7.23)	0.750
Afección gástrica, n (%)	113/447 (25.3%)	3/19 (15.8%)	110/428 (25.7%)	0.54 (0.16 – 1.90)	0.426
GAVE, n (%)	16/447 (3.6%)	0/19 (0%)	16/428 (3.7%)	0.96 (0.94-0.98)	1.000
Afección intestinal, n (%)	64/447 (14.3%)	2/19 (10.5%)	62/428 (14.5%)	0.69 (0.16 – 3.08)	1.000
<b>Afección hepática, n (%)</b>					
	25/447 (5.6%)	0 (0%)	25/428 (5.8%)	0.96 (0.94 – 0.98)	0.615
<b>Afección musculoesquelética, n (%)</b>					
Artritis, n (%)	170/447 (38.0%)	5/19 (26.3%)	165/428 (38.6%)	0.57 (0.20-1.61)	0.282
Roces tendinosos, n (%)	66/447 (14.8%)	2/19 (10.5%)	64/428 (15.0%)	0.67 (0.15 – 2.97)	1.000
Contracturas, n (%)	17/447 (3.8%)	1/19 (5.3%)	16/428 (3.7%)	1.43 (0.18 – 11.39)	0.529
Miositis, n (%)	29/447 (6.5%)	1/19 (5.3%)	28/428 (6.5%)	0.79 (0.10 – 6.16)	1.000
Miositis, n (%)	27/447 (6.0%)	2/19 (10.5%)	25/428 (5.8%)	1.90 (0.42 – 8.67)	0.321
Miopatía no inflamatoria, n (%)	11/447 (2.5%)	1/19 (5.3%)	10/428 (2.3%)	2.32 (0.28 – 19.14)	0.383
Calcinosis, n (%)	94/447 (21.0%)	2/19 (10.5%)	92/428 (21.5%)	0.43 (0.10 – 1.89)	0.388

<b>Afección pulmonar</b>	183/447 (40.9%)	13/19 (68.4%)	170/428 (39.7%)	3.29 (1.23 – 8.82)	<b>0.013</b>
Enfermedad pulmonar intersticial, n (%)	155/447 (34.7%)	11/19 (57.9%)	144/428 (33.6%)	2.71 (1.07 – 6.89)	<b>0.030</b>
Hipertensión arterial pulmonar, n (%)	51/447 (11.4%)	5/19 (26.3%)	46/428 (10.7%)	2.96 (1.02 – 8.61)	0.053
<b>PFR</b>					
<b>PFR basales, mediana (IQR)</b>					
FVC, mediana (IQR) L	2.9 (2.4 – 3.4)	2.5 (2.3 – 3.3)	2.9 (2.5 – 3.4)		0.139
FVC, % de esperado	92.0 (80.3 – 102.5)	88 (70.0 – 102.6)	92 (80.9 – 102.5)		0.221
DLCO, mediana (IQR), mmol/min/kPa	6.0 (4.7 – 9.3)	6.5 (5.8 – 15.3)	6.0 (4.7 – 8.8)		0.192
DLCO, % de esperado	72.0 (60.0 – 83.0)	72.0 (61.4 – 87.3)	72.0 (60.0 – 83.0)		0.939
<b>PFR al final del seguimiento, mediana (IQR)</b>					
FVC, L	2.6 (2.1 – 3.1)	2.4 (1.6 – 3.2)	2.6 (2.1 – 3.1)		0.222
FVC, % de esperado	93.0 (76.2 – 105.1)	88.0 (51.0 – 105.0)	93.0 (76.4 – 105.4)		0.357
DLCO, mmol/min/kPa	5.9 (4.1 – 10.3)	5.9 (4.1 – 13.6)	5.8 (4.1 – 5.8)		0.712
DLCO, % de esperado	68.0 (51.2 – 78.0)	64.0 (50.1 – 78.2)	68.0 (51.2 – 78.0)		0.980
<b>Afección cardíaca, n (%)</b>	145/447 (32.4%)	8/19 (42.1%)	137/428 (32.0%)	1.55 (0.61 – 3.98)	0.358
FEVI < 50%, n (%)	8/447 (1.8%)	0/19 (0%)	8/428 (1.9%)	0.96 (0.94 – 0.98)	1.000
Afección pericárdica, n (%)	36/447 (8.1%)	3/19 (15.8%)	33/428 (7.7%)	2.24 (0.62 – 8.10)	0.190
Cardiopatía isquémica sin FRCV	29/447 (6.5%)	0/19 (0.0%)	29/428 (6.8%)	0.96 (0.94 – 0.98)	0.625
Disfunción diastólica del VI, n (%)	118/447 (26.4%)	7/19 (36.8%)	111/428 (25.9%)	1.67 (0.64 – 4.34)	0.291
Alteraciones de la conducción, n (%)	79/345 (22.9%)	5/14 (35.7%)	74/331 (22.4%)	1.93 (0.63 – 5.93)	0.326
Fibrosis miocárdica, n (%)	5/223 (2.2%)	0/11 (0%)	5/212 (2.4%)	0.95 (0.92 – 0.98)	1.000
<b>Ecocardiograma basal</b>					
Fracción de eyección del VI, %	65.0 (60.0 – 70.0)	65.0 (58.0 – 70.0)	65.0 (60.0 – 69.0)		0.663
Presión arterial pulmonar sistólica (estimada), mediana (IQR), mmHg	28.0 (24.0 – 33.0)	30.0 (24.5 – 37.5)	28.0 (24.0 – 33.0)		0.391
Velocidad de regurgitación tricuspídea, m/s	2.3 (2.1 – 2.5)	2.50 (2.20 – 2.72)	2.30 (2.10 – 2.50)		<b>0.034</b>
<b>Afección renal</b>					
Crisis renal esclerodérmica, n (%)	4/447 (0.9%)	0/19 (0%)	4/428 (0.9%)	0.96 (0.94 – 0.98)	1.000
<b>Cáncer</b>					
Cáncer total, n (%)	76/447 (17.0%)	4/19 (21.1%)	72/428 (16.8%)	1.32 (0.43 – 4.09)	0.545
Cáncer sincrónico, n (%)	16/447 (3.6%)	0/19 (0%)	16/428 (3.7%)	0.96 (0.94 – 0.98)	1.000
<b>Tipos de cáncer</b>					
Cáncer de mama, n (%)	19 (4.3%)	2 (10.5%)	17 (4.0%)		
Cáncer de pulmón, n (%)	9 (2.0%)	0 (0.0%)	9 (2.1%)		
Cáncer ginecológico, n (%)	7 (1.6%)	0 (0.0%)	7 (1.6%)		

## Resultados

Cáncer hematológico, n (%)	15 (3.4%)	1 (5.3%)	14 (3.3%)		
Cáncer digestivo, n (%)	8 (1.8%)	0 (0.0%)	8 (1.9%)		
Cáncer de piel, n (%)	11 (2.46%)	1 (5.3%)	10 (4.3%)		
Otros, n (%)	8 (1.8%)	0 (0%)	8 (1.8%)		
<b>Mortalidad, n (%)</b>	43/447 (9.6%)	2/19 (10.5%)	41/428 (9.6%)	1.11 (0.25 – 5.00)	0.703
Relacionadas con ES	11/447 (2.5%)	1/19 (5.3%)	10/428 (2.3%)	2.32 (0.28 – 19.14)	0.383
EPI, n (%)	2/447 (0.4%)	0/19 (0.0%)	2/428 (0.5%)	0.96 (0.94 – 0.98)	1.000
HAP, n (%)	7/447 (1.6%)	1/19 (5.3%)	6/428 (1.4%)	3.91 (0.45 – 34.16)	0.264
Miocardiopatía relacionada con ES, n (%)	2/447 (0.4%)	0/19 (0.0%)	2/428 (0.5%)	0.96 (0.94 – 0.98)	1.000
No relacionadas con ES	32/447 (7.2%)	1/19 (5.3%)	31/428 (7.2%)	0.71 (0.09 – 5.51)	1.000
Cáncer, n (%)	11/447 (2.5%)	1/19 (5.3%)	10/428 (2.3%)	2.32 (0.28 – 19.14)	0.383
Otras, n (%)	21/447 (4.7%)	0/19 (0.0%)	21/428 (4.9%)	0.96 (0.94 – 0.98)	1.000
<b>Enfermedad pulmonar terminal</b>	57/447 (12.8%)	7/19 (36.8%)	50/428 (11.7%)	4.41 (1.66 – 11.72)	<b>0.006</b>
Oxigenoterapia, n (%)	20/447 (4.5%)	1/19 (5.3%)	19/428 (4.4%)	1.20 (0.15 – 9.44)	0.589
Trasplante pulmonar, n (%)	12/447 (2.7%)	1/19 (5.3%)	11/428 (2.6%)	2.11 (0.26 – 17.21)	0.410
FVC < 50% en cualquier momento, n (%)	43/447 (9.6%)	7/19 (36.8%)	36/428 (8.4%)	6.35 (2.35 – 17.14)	<b>0.001</b>
<b>Enfermedad pulmonar terminal o muerte</b>	81/447 (18.1%)	7/19 (36.8%)	74/428 (17.3%)	2.79 (1.06 – 7.33)	0.059
<b>Evolución</b>					
Progresión del endurecimiento cutáneo, n (%)	54/447 (12.1%)	5/19 (26.3%)	49/428 (11.4%)	2.76 (0.95 – 8.00)	0.066
Progresión de las úlceras digitales, n (%)	98/447 (21.9%)	6/19 (31.6%)	92/428 (21.5%)	1.67 (0.62 – 4.56)	0.392
<b>Tratamiento</b>					
Fármacos inmunosupresores	209/447 (46.8%)	13/19 (68.4%)	196/428 (45.8%)	2.57 (0.96 – 6.87)	0.053
Glucocorticoides	192/447 (43.0%)	11/19 (57.9%)	181/428 (42.3%)	1.88 (0.74 – 4.76)	0.179
Fármacos inmunosupresores no-corticoides	141/447 (31.5%)	11/19 (57.9%)	130/428 (30.4%)	3.15 (1.24 – 8.02)	<b>0.012</b>
Ciclofosfamida	50/447 (11.2%)	6/19 (31.6%)	44/428 (10.3%)	4.03 (1.46 – 11.13)	<b>0.013</b>
Rituximab	24/447 (5.4%)	4/19 (21.1%)	20/428 (4.7%)	5.44 (1.65 – 17.90)	<b>0.014</b>
Mycophenolato	95/447 (21.3%)	8/19 (42.1%)	87/428 (20.3%)	2.85 (1.11 – 7.30)	<b>0.039</b>
Azatioprina	49/447 (11.0%)	4/19 (21.1%)	45/428 (10.5%)	2.27 (0.72 – 7.14)	0.143
Metotrexate	38/447 (8.5%)	2/19 (10.5%)	36/428 (8.4%)	1.28 (0.26 – 5.77)	0.671
Tratamiento vasodilatador	164/447 (36.7%)	8/19 (42.1%)	156/428 (36.4%)	1.27 (0.50 – 3.22)	0.617
Antagonistas de los receptores de la endotelina	102/447 (22.8%)	6/19 (31.6%)	96/428 (22.4%)	1.60 (0.59 – 4.31)	0.401
Inhibidores de la fosfodiesterasa 5	62/447 (13.9%)	3/19 (15.8%)	59/428 (13.8%)	1.17 (0.33 – 4.15)	0.737

Prostaglandins	103/447 (23.0%)	5/19 (26.3%)	98/428 (22.9%)	1.20 (0.42 – 3.42)	0.781
<b>Anticuerpos</b>					
Anticuerpos antinucleares	421/447 (94.2%)	19/19 (100%)	402/428 (93.9%)	1.05 (1.03 – 1.07)	0.617
Anti-centromero	198/447 (44.3%)	5/19 (26.3%)	193/428 (45.1%)	0.44 (0.15 – 1.23)	0.107
Anti-topoisomerasa I	108/447 (24.2%)	2/19 (10.5%)	106/428 (24.8%)	0.36 (0.08 – 1.57)	0.270
Anti-RNA polimerasa III	23/283 (8.1%)	1/12 (8.3%)	22/271 (8.1%)	1.03 (0.13 – 8.34)	1.000
Tiempo de supervivencia media, a		26.2	66.0		0.341
<b>Supervivencia global acumulada</b>					
* 5 <sup>a</sup>		100%	99%		
* 10 <sup>a</sup>		100%	97%		
* 15 <sup>a</sup>		100%	96%		
* 20 <sup>a</sup>		100%	92%		
* 25 <sup>a</sup>		75%	89%		
* 30 <sup>a</sup>		0%	85%		
Tiempo medio hasta supervivencia libre de manifestaciones o muerte, a		25.6	55.3		<b>0.001</b>
<b>Proporción acumulada hasta EPT o muerte (oxigenoterapia, trasplante pulmonar, FVC &lt; 50% o muerte), a</b>					
* 5 <sup>a</sup>		94%	96%		
* 10 <sup>a</sup>		82%	92%		
* 15 <sup>a</sup>		67%	89%		
* 20 <sup>a</sup>		53%	84%		
* 25 <sup>a</sup>		53%	79%		
* 30 <sup>a</sup>		0%	77%		

ES: esclerodermia; a: años; FR: fenómeno de Raynaud; GAVE: ectasia vascular antral gástrica; EPI: enfermedad pulmonar intersticial; HAP: hipertensión arterial pulmonar; PFR: pruebas de función respiratoria; IQR: rango intercuartílico; FVC: capacidad vital forzada; DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono; FEVI: fracción de eyección del VI FRCV: factores de riesgo cardiovascular; VI: ventrículo izquierdo; EPT: enfermedad pulmonar terminal; p **negrita**: p < 0.05

## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA Y DEFINICIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO INDEPENDIENTES

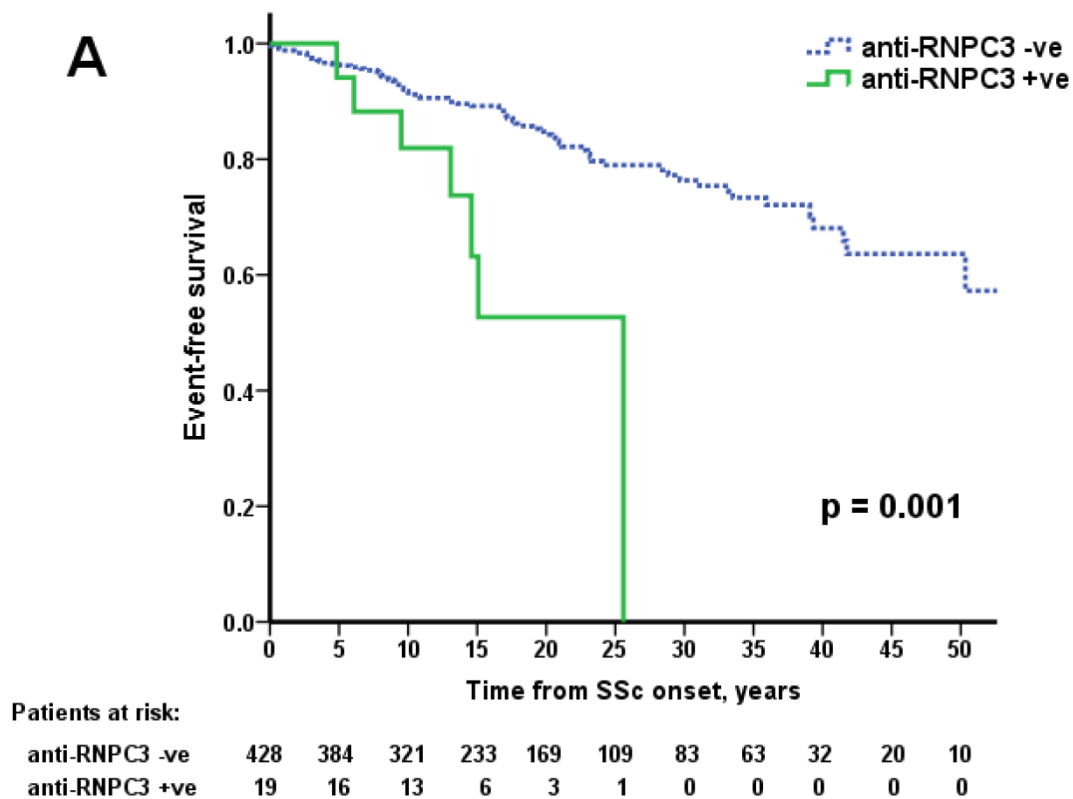
Hemos estimado y comparado las supervivencias de los pacientes dependiendo de la presencia de anti-RNPC3. Además, hemos comparado la supervivencia en la cohorte con EPI entre pacientes que eran anti-RNPC3+ y aquellos que expresaban ATAI.

## Resultados

La mediana de supervivencia global fue de 26.2 años en el grupo anti-RNPC3+, mientras que en el negativo fueron 66.0 años; esta diferencia no alcanzó la significación estadística (log-rank  $p=0.341$ ).

Las tasas de supervivencia acumulada global a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 años desde el primer síntoma fueron 100%, 100%, 100%, 100%, 75% y 0% en el grupo anti-RNPC3+ y 99%, 97%, 96%, 92%, 89% y 85% en el grupo negativo respectivamente (*ver tabla*).

En las curvas de Kaplan Meier, los pacientes con reactividad anti-RNPC3 presentaron menor supervivencia libre de muerte y de manifestaciones graves que los negativos (log-rank  $p=0.001$ ) (Fig. A), con una mediana de supervivencia libre manifestaciones de 25.6 años en el grupo anti-RNPC3+ frente a 55. años en el negativo.

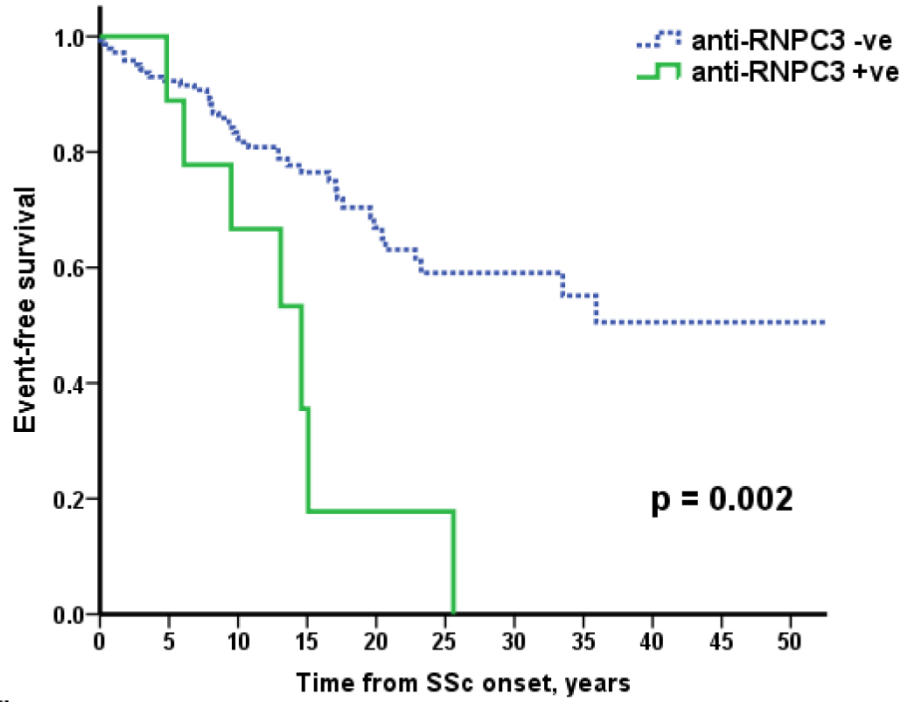


En el subanálisis de la supervivencia de los pacientes con afección pulmonar (EPI o HAP) no se observaron diferencias en las curvas de supervivencia de Kaplan Meier siendo la media global entre los grupos anti-RNPC3+ y anti-RNPC3- (24.0a vs. 66.0a, log rank  $p = 0.406$ ). La supervivencia acumulada a 5, 10, 15, 20, 25 y 30 años fueron 100%, 100%, 100%, 100%, 67% y 0% en el primer grupo y 99%, 95%, 93%, 88%, 83% y 78% en el segundo grupo, respectivamente. Sin embargo, el análisis de la supervivencia libre de muerte o manifestaciones en el grupo de pacientes con afección pulmonar fue significativamente menor en el grupo anti-RNPC3+ (15.6a vs. 55.3a, log rank  $p = 0.008$ ). La supervivencia libre de manifestaciones o muerte acumulada a 5, 10, 15, 20, 25 y 30 años fueron 92%, 73%, 49%, 24%, 24% y 0% en el grupo anti-RNPC3+ y 92%, 83%, 77%, 70%, 61% y 59% en el grupo anti-RNPC3 negativo.

Considerando únicamente los pacientes diagnosticados con EPI, no hubo diferencias en las curvas de Kaplan Meier cuando se analizó la supervivencia global. Sin embargo, se observaron diferencias en las curvas de supervivencia libre de manifestaciones graves o muerte analizadas por Kaplan Meier. En los pacientes anti-RNPC3+ (14.6a, vs. 55.3a, log rank  $p = 0.002$ ) (Fig. B). Las tasas de supervivencia acumulada a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 años fueron 90%, 68%, 41%, 20%, 20% y 0% en el grupo anti-RNPC3+ y 92%, 83%, 77%, 67%, 59% y 59% en el grupo negativo.

Entre los pacientes con EPI también se evidenciaron diferencias en las curvas de Kaplan Meier cuando se analizó la supervivencia libre de manifestaciones graves o muerte en el grupo anti-RNPC3+, comparado con los pacientes que expresaron ATAI (14.6a vs. 35.9a,  $p = 0.007$ ) (Fig. 1C) y comparado con pacientes que fueron negativos para ambos: ATAI y anti-RNPC3 (14.6a vs. 55.3a, log rank  $p = 0.008$ ).

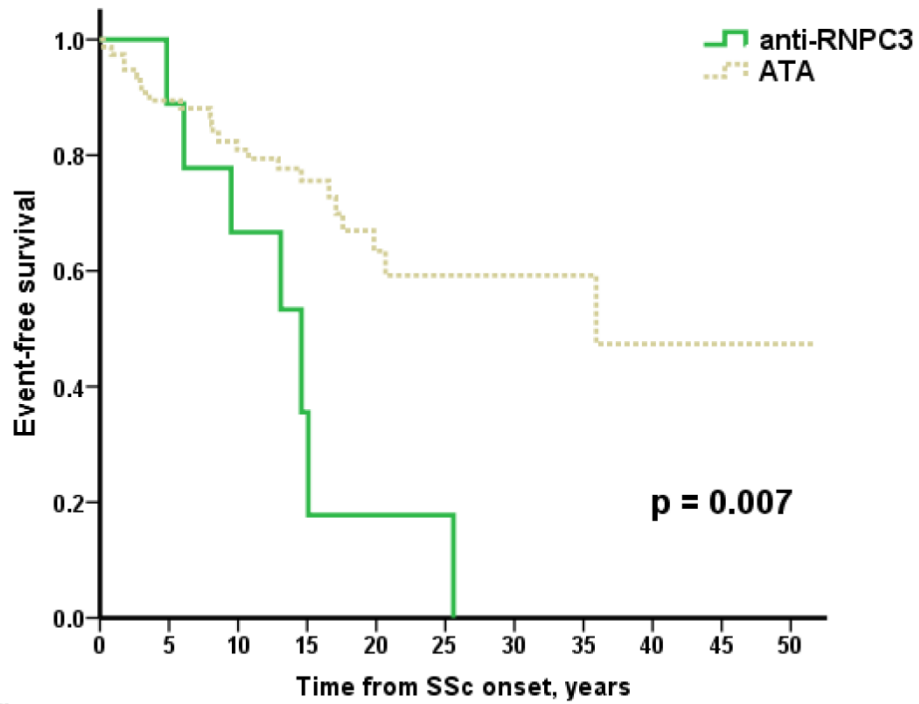
**B**



Patients at risk:

anti-RNPC3 -ve	144	126	99	56	37	25	20	14	5	5	4
anti-RNPC3 +ve	11	8	6	2	1	1	0	0	0	0	0

**C**



Patients at risk:

ATA	77	66	56	30	17	8	7	6	1	1	1
anti-RNPC3 +ve	11	8	6	2	1	1	0	0	0	0	0

La cohorte global se analizó con el objetivo de describir factores asociados con peor supervivencia. En el análisis univariante de la cohorte global, el sexo femenino se asoció a mejor pronóstico (hazard ratio (HR): 0.36, 95%CI 0.15-0.85). Las variables relacionadas con peor supervivencia fueron: la edad al inicio (HR: 1.10, 95%CI 1.07-1.13), la presencia de HAP (HR: 2.66, 95%CI 1.36-5.23) o la presencia de cáncer (HR: 2.09, 95%CI 1.09-3.99). En el estudio multivariante, los factores de riesgo independientes relacionados con peor pronóstico fueron edad al inicio (HR: 1.11, 95%CI 1.08-1.14) y la HAP (HR: 2.35, 95%CI 1.16-4.74 (*ver tabla al final del apartado*)).

En relación a la supervivencia libre de muerte o manifestaciones graves, en el modelo univariante de Cox se observó que el sexo femenino se asoció a un mejor pronóstico (HR: 0.26, 95%CI 0.15-0.46), así como la positividad de ACA (HR: 0.38, 95%CI 0.24-0.62), mientras que la positividad para anti-RNPC3 (HR: 3.61, 95%CI 1.64-7.94), el subtipo cutáneo difusa (HR: 2.88, 95%CI 1.73-4.80), la edad al inicio (HR: 1.05, 95%CI 1.03-1.06), la presencia de EPI (HR: 4.11, 95%CI 2.61-6.47) o HAP (HR: 4.11, 95%CI 2.58-6.54), la afección cardíaca (HR: 1.91, 95%CI 1.22-2.94) y la expresión de ATAI (HR: 1.98, 95%CI 1.24-3.16) se relacionaron con peor pronóstico (mayor mortalidad o manifestaciones graves). En el análisis multivariante los factores independientes asociados a un peor pronóstico fueron: el subtipo cutáneo difusa (HR: 1.84, 95%CI 1.02-3.33), la edad al inicio (HR: 1.06, 95%CI 1.04-1.08), la presencia de EPI (HR: 2.25, 95%CI 1.27-3.99), o HAP (HR: 4.05, 95%CI 2.32-7.07), la positividad de anti-RNPC3 (HR: 2.49, 95%CI 1.01-6.08) y la expresión de ATA (HR: 2.17, 95%CI 1.17-4.03). El sexo femenino se asoció de forma independiente a mejor pronóstico (HR: 0.36, 95%CI 0.20-0.68). (*ver tabla 5 al final del apartado*)).



**Tabla 5.1 Análisis univariante y multivariante para la supervivencia global.**

	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	HR	95% CI	P	HR	95% IC	P
Sexo femenino	0.36	(0.15-0.85)	<b>0.021<sup>a</sup></b>	0.43	(0.17-1.07)	0.070
Subtipo cutáneo difusa	1.13	(0.44-2.92)	0.801			
Edad al inicio, años	<b>1.10</b>	<b>(1.07-1.13)</b>	<b>&lt; 0.001<sup>a</sup></b>	1.11	(1.08-1.14)	<b>&lt; 0.001</b>
Enfermedad pulmonar intersticial	1.67	(0.89-3.15)	0.112 <sup>a</sup>	1.64	(0.85-3.16)	0.143
Hipertensión arterial pulmonar	2.66	(1.36-5.23)	<b>0.004<sup>a</sup></b>	2.22	(1.09-4.51)	<b>0.027</b>
Afección cardíaca	1.04	(0.55-1.94)	0.913			
Crisis renal esclerodérmica	0.05	(0.00-13310673.4)	0.761			
Cáncer	2.09	(1.09-3.99)	<b>0.026<sup>a</sup></b>	1.66	(0.85-3.23)	0.135
Anti-RNPC-3	1.98	(0.47-8.35)	0.350			
Anti-centromero	0.74	(0.40-1.38)	0.342			
Anti-topoisomerasa I	1.30	(0.63-2.66)	0.476			
Anti-RNA polimerasa III	1.59	(0.37-6.88)	0.532			

IC: intervalo de confianza; FCV: capacidad vital forzada; *p* negrita:  $p < 0.05$

<sup>a</sup>Variables incluidas en el análisis multivariante.

**Tabla 5.2 Análisis univariante y multivariante para la supervivencia libre de muerte o manifestaciones graves**

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P	HR	95% IC	P
Sexo femenino	0.26	(0.15-0.46)	<b>&lt; 0.001<sup>a</sup></b>	0.33	(0.17-0.64)	<b>0.001</b>
Subtipo cutáneo difusa	2.88	(1.73-4.80)	<b>&lt; 0.001<sup>a</sup></b>	1.84	(1.02-3.33)	<b>0.043</b>
Edad al inicio, años	1.05	(1.03-1.06)	<b>&lt; 0.001<sup>a</sup></b>	1.06	(1.04-1.08)	<b>&lt; 0.001</b>
Enfermedad pulmonar intersticial	4.11	(2.61-6.47)	<b>&lt; 0.001<sup>a</sup></b>	2.25	(1.27-3.99)	<b>0.006</b>
Hipertensión arterial pulmonar	4.11	(2.58-6.54)	<b>&lt; 0.001<sup>a</sup></b>	4.05	(2.32-7.07)	<b>&lt; 0.001</b>
Afección cardíaca	1.89	(1.22-2.94)	<b>0.004<sup>a</sup></b>	0.98	(0.59-1.62)	0.939
Crisis renal esclerodérmica	0.05	(0.00-39188.47)	0.664			
Cáncer	1.45	(0.87-2.40)	0.153 <sup>a</sup>			
Anti-RNPC-3	3.61	(1.64-7.94)	<b>0.001<sup>a</sup></b>	2.49	(1.01-6.08)	<b>0.046</b>
Anti-centromero	0.38	(0.24-0.62)	<b>&lt; 0.001<sup>a</sup></b>	0.81	(0.41-1.62)	0.552
Anti-topoisomerasa I	1.98	(1.24-3.16)	<b>0.004<sup>a</sup></b>	2.17	(1.17-4.03)	<b>0.014</b>
Anti-RNA polimerasa III	1.17	(0.42-3.25)	0.759			

HR: Hazard ratio; IC: intervalo de confianza; *p* negrita:  $p < 0.05$

<sup>a</sup>Variables incluidas en el análisis multivariante.

## **6. DISCUSIÓN GENERAL**



La presencia de diferentes ANAs es uno de los aspectos característicos de la ES. Está bien estudiada la utilidad de los mismos en la enfermedad en cuanto al diagnóstico, seguimiento, clasificación en los diferentes subtipos clínicos y pronóstico de los pacientes. Además, nos ayudan a predecir complicaciones clínicas. La mayoría de los pacientes expresan algún ANA específico de ES de manera excluyente. Por otro lado los anticuerpos específicos de ES rara vez se observan en pacientes con otras enfermedades autoinmunes sistémicas (EAS) <sup>128</sup>.

En el presente trabajo de investigación analizamos dos anticuerpos específicos de la enfermedad que se expresan con baja frecuencia. El anti-RNAP III es el menos frecuente de los tres incluidos en los criterios clasificatorios de 2013 <sup>30</sup>. Se trata de un anticuerpo importante en la ES por sus implicaciones clínicas y pronósticas, ya que se asocia a manifestaciones clínicas graves de la enfermedad como la CRE y el cáncer sincrónico <sup>120-122</sup>. Por otro lado, y en base a la bibliografía previa, es un anticuerpo poco estudiado en países mediterráneos, no existiendo hasta ahora ningún estudio amplio unicéntrico que examine las características clínicas y la supervivencia de los pacientes que expresan dicho anticuerpo en una cohorte española.

En cuanto al anticuerpo anti-RNPC3 existen escasos trabajos de investigación dado que hasta la actualidad sólo se ha podido determinar por IP. En la cohorte inicial se describió asociación con afección orgánica grave como la fibrosis pulmonar; además también se describió asociación con afección gastrointestinal grave y cáncer sincrónico <sup>65,151,152</sup>. El hecho de no disponer de técnicas de laboratorio que permitan su determinación es un aspecto relevante en la práctica clínica que ha impedido realizar estudios con otras cohortes con las que se validasen las asociaciones descritas. Si se

### Discusión general

confirman y validan las asociaciones clínicas previamente descritas en una cohorte en la que se determine el anticuerpo con una técnica de más fácil aplicación se podría mejorar el diagnóstico serológico de pacientes con ES, con las implicaciones clínico pronósticas y de tratamiento que conlleva. El estudio realizado es el primero focalizado en estudiar las características clínicas asociadas a este anticuerpo de forma amplia, determinado por PMAT y focalizado en la EPI, así como la supervivencia, comparándolo con pacientes anti-RNPC3 negativo y con pacientes que expresan otros anticuerpos.

**Estudio de investigación 1: Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNA polimerasa III**

En el estudio observamos una asociación entre el anticuerpo anti-RNAP III y las siguientes manifestaciones clínico epidemiológicas: menor retraso diagnóstico de la enfermedad y mayor frecuencia de subtipo cutáneo difusa, CRE, HTA y de manifestaciones musculoesqueléticas tales como artritis, roces tendinosos y contracturas tendinosas. En cuanto a la supervivencia, no hemos evidenciado diferencias entre los dos grupos analizados dependiendo de la presencia de anti-RNAP III.

La prevalencia del anticuerpo en la cohorte del estudio (11.8%) es similar a la que se comunica en estudios previos y en el último metaanálisis <sup>165</sup>, siendo comparable a la encontrada en las cohortes del sur de Europa (Francia e Italia), donde se sitúan entre el 6.6-12.1% <sup>166-169</sup>, y más baja que la descrita en Estados Unidos (26%) <sup>122</sup>, Canadá (18.6%) <sup>180</sup>, Europa del norte (21.7-22%) <sup>181,182</sup> y Nueva Zelanda (20%) <sup>183</sup>. Existen diferentes estudios que han establecido la prevalencia del anti-RNAP III en Europa <sup>122,164-167</sup>, pero esta es la primera vez que se realiza un estudio de prevalencia y de definición del perfil clínico en una cohorte con positividad anti-RNAP III en España. La similitud entre las cifras encontradas entre regiones cercanas geográficamente indican que existen factores genéticos y ambientales que puedan influenciar <sup>184</sup>. Por otro lado, países situados en latitudes similares presentan prevalencias semejantes, lo que apoya esta teoría.

El subtipo cutáneo difusa estuvo presente en el 76.9%, siendo el subtipo cutáneo más frecuente en el grupo de pacientes que expresan anti-RNAP III, los porcentajes son similares a los descritos en las series publicadas <sup>163,185</sup>.

## Discusión general

En relación con la presencia de GAVE los resultados no son homogéneos. En el estudio actual, hemos encontrado una prevalencia similar entre ambos grupos (13.3% vs. 13.4%); tampoco observaron diferencias en las prevalencias de GAVE en el estudio de *Hung et al.* (35.7% vs. 28.9%)<sup>186</sup>. Sin embargo, en el año 2014 el grupo EUSTAR realizó un estudio en el que se objetivaron diferencias significativas de la prevalencia de GAVE dependiendo de la presencia de RNAP (63% vs. 27%,  $p = 0.01$ ), siendo la OR de presentar GAVE s de 4.6 (95% CI 1.2-21.1)<sup>174</sup>. Más recientemente, en una cohorte de Estados Unidos se seleccionaron 225 pacientes con ES a los que se les había realizado una FGS, y se compararon los pacientes que presentaban GAVE y los que no. Se observó que aquellos con GAVE expresaban con mayor frecuencia anti-RNAP III (71% vs. 19%,  $p < 0.01$ ), los pacientes también presentaban mayor prevalencia de CRE (21 vs. 3%,  $p < 0.01$ )<sup>187</sup>.

En la cohorte del estudio se observó una mayor incidencia de manifestaciones musculoesqueléticas como la artritis, probablemente la asociación se justifique por la mayor prevalencia de subtipo cutáneo difusa. En otras series europeas también se observó esta tendencia cuando se compararon los pacientes que expresan anti-RNAP III con los que expresan ACA (43.5% vs. 20.1%)<sup>188</sup>. Concomitantemente, se ha descrito asociación entre la presencia de anti-RNAP III y otras enfermedades del tejido conectivo con expresión fundamentalmente articular como la artritis reumatoide<sup>163</sup>.

Aproximadamente la mitad de los pacientes con anti-RNAP III están afectados de EPI, lo que es ligeramente superior a lo publicado en otras series<sup>118,145,189</sup>, pero similar a un estudio noruego (51%)<sup>190</sup>. En ambos estudios el diagnóstico de EPI se realizó por TC. Teniendo en cuenta el resultado del TC y PFR, *Hoffmann-Vold et al.*<sup>190</sup> proponen

clasificar a los pacientes en dos grupos en el momento del diagnóstico. Un primer grupo con hallazgos normales en ambas pruebas, los cuales presentan riesgo bajo de desarrollar EPI, y un segundo grupo en el que algunas de estas pruebas salen alteradas y presentan un riesgo mayor de desarrollar EPI, por lo que es recomendable realizar un seguimiento estrecho y un tratamiento precoz si se detecta EPI. Los mismos autores sugieren que los pacientes con anti-RNAP III presentan progresión de la EPI más rápida que los pacientes con EPI y otros anticuerpos. *Hoffmann-Vold et al.*<sup>190</sup> no observaron diferencias en los valores de la FVC entre pacientes anti-RNAP III comparados con los que presentaban ATAI. En esta misma línea, en el estudio actual no se evidenciaron diferencias en los valores de la FVC entre ambos grupos, probablemente debido al bajo número de ATAI en el grupo anti-RNAP III negativo.

En relación con la enfermedad vascular pulmonar, la prevalencia encontrada de HAP es similar a la previamente descrita<sup>7,145,163,168,190</sup> sin poder establecer relación entre la presencia de esta complicación y el anticuerpo. En la mayoría de estudios no se evidencia asociación entre la HAP y la positividad para anti-RNAP III, pero hay que tener en cuenta que mayoritariamente el diagnóstico de la HAP no se realiza por cateterismo derecho<sup>104,168</sup>. En el análisis multivariante realizado en una cohorte de alrededor de 400 pacientes, se observó que el anti-RNAP III es un factor de riesgo independiente de desarrollo de HAP diagnosticada por cateterismo derecho<sup>47</sup>. En el estudio actual la frecuencia de HAP en los pacientes con anti-RNAP III positivos es similar a la de las cohortes globales (11.8%), por lo tanto, en los pacientes con anti-RNAP III, igual que en el resto de pacientes con ES es necesario realizar un correcto cribaje de esta complicación durante el seguimiento.



## Discusión general

La asociación entre CRE y presencia de anti-RNAP III está bien establecida<sup>7,61,170-172</sup>, describiéndose una prevalencia de CRE en los pacientes que expresan el anticuerpo del 24%<sup>172</sup>. La CRE ocurre en el 5% de los pacientes con ES, estando presente el anti-RNAP III en el 58% de los casos<sup>170</sup>. Clínicamente los hallazgos clínicos más frecuentemente observados son la hipertensión arterial en un 78% de los pacientes, encefalopatía hipertensiva en un 58% y microangiopatía trombótica en un 56%<sup>61</sup>. De manera concordante con lo publicado previamente, en la cohorte del estudio se ha observado una relación entre afección renal en forma de CRE e HTA y expresión de anti-RNAP III, por lo que es fundamental un control de cifras tensionales y análisis de sangre y orina en este grupo de pacientes. Es importante resaltar que, tal como se mencionó previamente, los pacientes que expresan anti-RNAP III tienen más frecuencia de manifestaciones musculoesqueléticas como contracturas tendinosas, roces tendinosos y artritis, lo que los expone a mayor uso de glucocorticoides (GC), por lo que es fundamental conocer el aumento de riesgo de CRE con el uso de GC<sup>61</sup> e intentar utilizar las dosis más bajas posibles y durante el mínimo período de tiempo.

*Shah et al.*<sup>122</sup> y *Airò et al.*<sup>164</sup> describieron la asociación con cáncer en un grupo pequeño de pacientes en los años 2010 y 2011 respectivamente, pero no fue hasta el año 2014 cuando esta relación se confirmó por *Moinzadeh et al.*<sup>121</sup> En éste último estudio en el que incluyeron más de 2100 pacientes se observó una frecuencia de cáncer en los pacientes que expresaban anti-RNAP III del 14.2%, siendo significativamente mayor comparada con los pacientes que expresaban ATA (6.3%) o ACA (6.8%)<sup>121</sup>. De los 154 pacientes con cáncer que expresaban anti-RNAP III, 65 eran neoplasias de mama, 19 hematológicos, 16 pulmonares, 17 gastrointestinales y 17 ginecológicos. Además de un aumento del riesgo global de neoplasia, también se evidenció una asociación entre el

inicio de la ES y el diagnóstico de cáncer (cáncer sincrónico) <sup>122,191</sup>. En 2018, *Igusa et al.*<sup>192</sup> describieron una razón de incidencia estandarizada de presentar cáncer sincrónico (en torno a los 3 años de diagnóstico de enfermedad) del 1.83 (95%CI 1.1-2.86) en los pacientes que expresaron anti-RNAP III. Por otro lado, en los últimos meses se ha descrito un mejor pronóstico de los pacientes con esclerodermia y cáncer que expresan ANA respecto a los ANA negativos <sup>193</sup>. En un estudio en el que se incluyeron más de 1700 pacientes, *Gauderon et al.*<sup>194</sup> observaron que los pacientes que tenían ANA con patrón IFI nucleolar se asociaban con aumento de riesgo relativo de cáncer (RR 1.5, 95%IC 1.03-2.03), describiéndose asociación entre anti-RNAP III y cáncer en un 14%. Dados estos resultados proponen que se consideren pacientes de riesgo y tributarios de cribaje de neoplasia a aquellos que expresen patrón nucleolar. Por el contrario, los que expresaban patrón homogéneo o moteado se asociaron significativamente con ausencia de cáncer ( $p < 0.01$ ) <sup>194</sup>. En un estudio realizado por *Bernal-Bello et al.*<sup>127</sup> con la cohorte del HVH se observó que la presencia de anti-PM/Scl era un factor independiente asociado a neoplasia, teniendo en cuenta que el anti-PM/Scl se presenta con patrón de IFI nucleolar, se confirma que la presencia de este patrón obliga a realizar cribaje activo de neoplasia.

En un estudio realizado con muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer que expresaban anti-RNAP III, se objetivó en 6 de 8 pacientes mutación en el gen *polimerasa III polipéptido A (POLR3A)*, sugiriendo que el desencadenante antigénico podría localizarse en células tumorales mutadas <sup>195</sup>. Teniendo en cuenta esta relación, en un trabajo reciente del grupo EUSTAR se propone un programa de cribaje de neoplasia en estos pacientes <sup>196</sup>. En la cohorte del estudio, se ha detectado una prevalencia similar de cáncer en el grupo anti-RNAP III a lo previamente descrito <sup>121,172</sup> y en concordancia

## Discusión general

con algunos trabajos recientemente publicados, no encontramos diferencias comparándolos con los pacientes que no expresan el anticuerpo <sup>127,190</sup>.

A pesar del largo periodo de seguimiento (38 años), no se observaron diferencias significativas en la supervivencia entre los grupos anti-RNAP III positivo y negativo, tanto desde el primer síntoma incluyendo FR como desde la primera manifestación clínica diferente FR.

En el análisis multivariante los factores independientes asociados a peor pronóstico fueron la CRE, la EPI con valores de FVC menor del 50% del esperado y la HAP (diagnosticada por cateterismo). El subtipo cutáneo difusa, la expresión de anti-RNAP III, ATAI o ACA no fueron factores pronósticos independientes. El estudio actual es el primero en que se han definido factores de riesgo independientes asociados a peor supervivencia en pacientes que expresan anti-RNAP III.

Una de las limitaciones del trabajo es la utilización de 2 técnicas para la determinación de del anticuerpo anti-RNAP III, ya que fue medido por ELISA e inmunoblot (EUROIMMUN). Ambos métodos presentan alta sensibilidad y especificidad comparadas con la IP, considerada el *gold standard* <sup>197,198</sup>.

Las fortalezas del estudio son que la población estudiada es homogénea y los datos se han obtenido de un único centro con lo que se minimiza la variabilidad inter observador en la interpretación de las manifestaciones clínicas y la realización de pruebas complementaria sen el momento del diagnóstico y durante el seguimiento. Otro punto fuerte es la definición de factores asociados a peor pronóstico.

El anticuerpo anti-RNAP III está incluido en los últimos criterios clasificatorios ACR/EULAR 2013, y su positividad puede tener implicaciones clínico pronósticas. Basándonos en la literatura previa, esta es la primera vez en que se define la prevalencia y sus características clínicas y epidemiológicas, así como el análisis de supervivencia en una cohorte española. Hemos encontrado que el grupo anti-RNAP III positivo tiene más prevalencia de enfermedad cutáneo difusa, menos tiempo entre el inicio y el diagnóstico de la ES, menos frecuencia de FR como primer síntoma y más CRE e HTA.

**Estudio de investigación 2: Prevalencia y Perfil clínico pronóstico de los pacientes con esclerodermia y anticuerpos anti-RNPC3**

Los anticuerpos anti-RNPC3 son poco prevalentes en la ES <sup>65,151,152</sup>, pero relevantes ya que se encuentran en pacientes que no expresan otros anticuerpos, pudiendo identificar un subgrupo de enfermos con riesgo de presentar enfermedad pulmonar grave <sup>152</sup>. Nuestro objetivo fue determinar anti-RNPC3 por la técnica PMAT y describir las características clínico pronósticas de los pacientes con anti-RNPC3 y específicamente valorar la implicación pronóstica de la presencia de anti-RNPC3 en los pacientes con EPI. En nuestra cohorte, describimos una prevalencia de anti-RNPC3 de 4.3%, asociándose a EPI y a peor pronóstico tanto en la cohorte global como en el subgrupo con EPI. Los resultados son similares a los que se observaron en la cohorte en la que se describió por primera vez el anticuerpo por IP, por lo que la técnica PMAT podría ser de utilidad para la detección de este anticuerpo.

En cuanto a la prevalencia, fue similar a la previamente descrita en dos cohortes de Estados Unidos <sup>151,152</sup> (3.2 y 3.8%, respectivamente). La frecuencia de subtipo cutáneo limitada también fue comparable a las cohortes previas. El patrón por IFI más frecuente fue el moteado (RNP like), tal y como se ha observado en estudios anteriores <sup>151</sup>.

En la misma línea que los trabajos previos, hemos observado mayor afección pulmonar, con mayor prevalencia de EPI en los pacientes que expresan anti-RNPC3 que en la cohorte negativa. La prevalencia de EPI fue del 57.9%, menor de la que se observó en los estudios de *Fertig et al* <sup>152</sup>. y por *McMahan et al* <sup>65</sup>. (79% y 77% respectivamente). La menor prevalencia probablemente se justifique por la diferente metodología en la

detección de EPI: en el estudio actual hemos considerado únicamente el TCAR mientras que *Fertig et al.*<sup>152</sup> definieron EPI como fibrosis pulmonar o áreas de vidrio esmerilado objetivado por radiografía de tórax o TC; *McMahan et al.*<sup>65</sup> no definen en su artículo los criterios de EPI. En cuanto a la gravedad de la EPI observamos que un 36.8% del grupo anti-RNPC3+ presentaban EPT, con diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo con RNPC negativo que sólo presentaban EPT en un 11.7% ( $p = 0.006$ ). En el subanálisis que se realizó considerando únicamente los pacientes con EPI, los que expresaban anti-RNPC3 progresaban más rápidamente que los negativos, con una mediana de supervivencia libre de manifestaciones de 14.6 años, comparado con 55.3 años en el grupo negativo. En la misma línea, comparados con los pacientes con EPI que expresan ATAI, también se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana de supervivencia libre de manifestaciones graves (14.6a vs. 35.9a,  $p = 0.007$ ). *Fertig et al.*<sup>152</sup>, evidenciaron que la causa de muerte por fibrosis pulmonar en el grupo anti-RNPC3 fue significativamente más frecuente que en los pacientes con ATAI, lo que traduce también una mayor gravedad de la EPI en el grupo anti-RNPC3+.

La supervivencia global se analizó desde el primer síntoma atribuible a la ES. La supervivencia acumulada a los 10 años fue del 100% en el grupo anti-RNPC3+, mayor que la observada por *Fertig et al.*<sup>152</sup> quienes describieron una supervivencia a los 10 años del 66%. En los pacientes con EPI la supervivencia estimada a los 10 años fue del 100% y a los 25 años del 67%. No podemos comparar las supervivencias con las que se observaron en el estudio de *Fertig et al.*<sup>152</sup>, porque en su cohorte el seguimiento fue de 6.9 años. La mejor supervivencia de los pacientes con EPI de la cohorte actual en relación con la cohorte de *Fertig et al.*<sup>152</sup> puede justificarse por el mayor número de pacientes que seguían tratamiento inmunosupresor (ciclofosfamida, rituximab, micofenolato).

## Discusión general

En un estudio previo *Shah et al*<sup>151</sup> se describió que la presencia de anti-RNPC3 se asociaba a HAP definida por aumento de la presión sistólica de ventrículo derecho (PSVD) estimada por ecocardiografía. En el grupo anti-RNPC3+, se observó una PSVD de 43mmHg (mediana, IQR: 35-51mmHg), mientras que en el grupo negativo para ACA, ATA y anti-RNAP (CTP-negativo) fue de 34mmHg (IQR: 30-42mmHg)<sup>151</sup>. En nuestra cohorte, hemos encontrado un aumento de la velocidad de regurgitación tricuspídea medida por ecografía al inicio del seguimiento, con una tendencia a presentar mayor HAP diagnosticada por cateterismo (26.3% vs 11.4%). Uno de los motivos por los que no se alcanza la significación estadística podría ser el pequeño número de pacientes con HAP en el grupo positivo (únicamente 5). Sin embargo, hemos encontrado que 5/19 (26.3%) de los pacientes en el grupo anti-RNPC3+ presentó HAP, siendo un porcentaje mayor comparado con la prevalencia en nuestra cohorte global (21/447, 11.4%) y con las prevalencias habituales de HAP en las cohortes de pacientes con ES<sup>199,200</sup>. Es necesario realizar más estudios para confirmar esta asociación.

En el estudio de *Shah et al.*<sup>151</sup>, se describió la asociación entre anti-RNPC3 y cáncer y su relación temporal. Los autores seleccionaron 318 pacientes con ES y cáncer, de los cuales 70 (22.0%) fueron positivos para anti-RNAP III, 54 (17.0%) para ATAI y 96 (30.2%) para ACA. Doce pacientes (3.8% de la cohorte global y 12.2% del grupo CTP-negativo definido como ATAI, ACA y anti-RNAP III negativos) fueron positivos para anti-RNPC3. Una característica destacada es que el intervalo entre el diagnóstico de cáncer y el diagnóstico de ES en los pacientes positivos fue de 0.9 años. Comparado con pacientes que expresan ACA, los anti-RNPC3+, tienen un riesgo de presentar cáncer sincrónico (a los 2 años de inicio de la ES) 4.3 veces mayor (OR 4.3; 95%CI 1.10–16.9;  $p = 0.037$ )<sup>151</sup>.

En 2018, en otro estudio con más de 2300 pacientes, *Igusa et al.*<sup>192</sup>, describieron que el riesgo de cáncer estaba aumentado en torno a los 3 años del inicio de la ES en el grupo de pacientes CTP-negativo (SIR: 1.83; 95%CI 1.1-2.86)<sup>192</sup>, destacando los propios autores que este hallazgo podría explicarse por la existencia de otros anticuerpos en esta cohorte que confieren un aumento de riesgo de cáncer, como el anti-RNPC3. En el estudio actual no hemos observado asociación entre anti-RNPC3 y cáncer en pacientes con ES. Los motivos podrían ser la diferencia de tiempo entre el inicio del cáncer y la toma de muestras de sangre y la baja prevalencia de neoplasia en nuestras cohortes (solo cuatro en el grupo positivo para anti-RNPC3). La prevalencia de cáncer en el grupo anti-RNPC3+ fue del 21% (4 de 19 pacientes). Esta prevalencia es superior a la publicada previamente en cohortes generales de ES. Así en un estudio de *Bernal-Bello et al.*<sup>127</sup> realizado con la cohorte de HVH en la que se incluyeron 432 pacientes se observó una prevalencia del 12.2%<sup>127</sup>.

*Shah et al.*<sup>151</sup> evidenciaron una asociación de anti-RNPC3 con miopatía (definida por presentar de enzimas musculares anormales o hallazgos patológicos en electromiografía, biopsia muscular o resonancia magnética), presente en 4 (33,3%) pacientes en el grupo anti-RNPC3+<sup>151</sup>. En la cohorte del estudio no encontramos asociación ni con miositis, ni con miopatía no inflamatoria.

La asociación con afección gastrointestinal fue estudiada por *McMahan et al.*<sup>65</sup>, quienes testaron para anti-RNPC3 sueros de pacientes con y sin afección gastrointestinal. En los pacientes positivos para anti-RNPC3, se objetivó una disfunción gastrointestinal moderada-grave (escala gastrointestinal de Medsger > 2) en el 36% de los pacientes, comparados con el 15% de pacientes negativos ( $p < 0.001$ ). Además, la positividad para



## Discusión general

anti-RNPC3 se asoció a enfermedad GI moderada-grave (OR: 3.8; 95%CI 1.0-14.3). Aunque nuestro estudio no se focalizó en analizar la gravedad de la enfermedad gastrointestinal, no encontramos diferencias en la afección global, ni en la presencia de GAVE, afección esofágica, gástrica o intestinal.

En cuanto al análisis de supervivencia, *Fertig et al*<sup>152</sup>. describieron que en la cohorte de pacientes con EPI, la expresión de anticuerpos anti-RNPC3 se asoció con un riesgo 2.25 veces mayor de muerte o trasplante de pulmón en comparación con el grupo negativo. En la misma línea, en nuestro estudio, en el análisis multivariante encontramos un riesgo 2.49 veces mayor (IC del 95% 1.01-6.08) de EPT o muerte asociada con el anticuerpo anti-RNPC3.

En el análisis de cohorte global los únicos dos factores relacionados con una peor supervivencia fueron la edad al inicio y la presencia de HAP. Ambos factores están asociados a mal pronóstico en la mayoría de las cohortes<sup>56,201</sup> de pacientes con ES.

La detección de anticuerpos anti-RNPC3 utilizando nuevas técnicas como la nueva tecnología multi analítica basada en partículas (PMAT) puede mejorar el diagnóstico serológico de los pacientes con ES. Es importante considerar este anticuerpo en pacientes que expresan ANA con patrón moteado en la IFI y sin anticuerpos específicos de esclerodermia, ya que es un marcador que nos ayuda a detectar pacientes en riesgo de desarrollar EPI grave. Debido a su peor pronóstico, estos pacientes requieren un seguimiento estrecho de la enfermedad pulmonar y si es necesario, un tratamiento agresivo precoz. En el estudio actual se ha utilizado PMAT para determinar el anticuerpo anti-RNPC3, siendo la primera vez que se utiliza una técnica no radioactiva para testar el

anticuerpo, ya que en todos los estudios previos se utilizó la IP. El fenotipo clínico que describimos en nuestra cohorte es similar al comunicado anteriormente (prevalencia similar del anticuerpo, tasas comparables de subtipo cutáneo limitada, EPI más frecuentes y más agresivas en el grupo positivo), lo que apoya que la técnica PMAT tenga buena correlación con la IP.

Consideramos que son necesarios más estudios ampliando el número de pacientes para validar los resultados obtenidos con la técnica PMAT y para confirmar nuestros resultados y las asociaciones descritas con cáncer y su relación temporal y la afección gastrointestinal grave.

Algunas limitaciones del estudio son que no ajustamos los resultados pulmonares con el consumo de tabaco y no evaluamos la gravedad de algunas características clínicas como el FR o la afección digestiva. En cuanto a los puntos fuertes podemos destacar que los pacientes fueron seleccionados en solo dos centros, por lo que se garantiza la homogeneidad tanto en la recogida de datos como en el seguimiento de los pacientes.

## **7. CONCLUSIONES**



## Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer son las siguientes:

- 1- Los pacientes que expresan anti-RNAP III presentaban de manera estadísticamente significativa mayor frecuencia de: subtipo cutáneo difusa, artritis, CRE e HTA. El tiempo entre el inicio y el diagnóstico de la enfermedad era menor. El Fenómeno de Raynaud como primera manifestación clínica fue significativamente menos frecuente. No se evidenció asociación con cáncer (global y/o cáncer sincrónico) ni con la presencia de GAVE.
- 2- En el estudio de supervivencia no se observaron diferencias en las curvas de Kaplan Meier entre ambos grupos (anti-RNAPIII positivo y negativo). Los factores independientes asociados a un peor pronóstico en la cohorte anti-RNAP III positivo fueron la CRE, la EPI con FVC menor del 50% del esperado y la HAP.
- 3- El grupo de pacientes que expresaban anti-RNPC3 presentaban de manera estadísticamente significativa mayor frecuencia de EPI, de EPI grave, de Enfermedad pulmonar terminal y peor supervivencia. No se evidenció una asociación con cáncer (global y/o cáncer sincrónico) ni con la afección gastrointestinal. La supervivencia libre de muerte o manifestaciones graves fue menor en el grupo anti-RNPC3+ tanto en la cohorte global como en el subgrupo con EPI. Los factores de riesgo independientes asociados a peor supervivencia fueron la edad y la presencia de HAP. Los factores de riesgo independientes asociados a peor pronóstico (muerte y/o manifestaciones graves) fueron la presencia de anti-RNPC3, el subtipo cutáneo difusa, la edad al inicio, la presencia de EPI, la HAP y la expresión de ATAI.

- 4- En el subgrupo con EPI, la supervivencia libre de muerte o manifestaciones graves fue menor en los pacientes que expresaron anti-RNPC3 comparado con los pacientes que expresaron ATAI.
  
- 5- El fenotipo clínico descrito en los pacientes que expresan anti-RNPC3 determinado por PMAT es similar al que se definió en el estudio el anti-RNPC3 se detectó por IP. Por lo tanto, la técnica de PMAT puede ser útil para determinar anti-RNPC3 en la práctica clínica diaria.

## **8. LINEAS DE FUTURO**





### Líneas de futuro

Los resultados de esta tesis doctoral aportan información en relación al perfil clínico pronóstico de los pacientes que expresan dos anticuerpos poco estudiados: RNAPOL y RNPC3.

En relación al estudio de pacientes con anti-RNAP III consideramos que sería interesante confirmar los factores asociados a mal pronóstico en otras cohortes. También creemos necesario establecer si la asociación con cáncer es específica de determinadas mutaciones que no se presentan en todos los pacientes con anti-RNAP III e incluso si existen determinadas subunidades del RNA polimerasa que se asocian de manera específica a cáncer y de esta manera poder realizar algoritmo de cribaje de cáncer de manera más individualizada.

En el estudio de perfil clínico de los pacientes con anti-RNPC3, el fenotipo clínico concuerda con el descrito previamente utilizando IP pero es fundamental validar la técnica PMAT para poder implementarla en la práctica clínica diaria ya que permite identificar pacientes que presentan EPI grave y mal pronóstico. En cuanto a la asociación con cáncer es necesario realizar estudios con un mayor número de pacientes.

Determinar el perfil clínico pronóstico de los pacientes que expresen anti-RNAP III y anti-RNPC3 en cohortes de diferentes países sería de utilidad para comprender el diferente comportamiento de estos anticuerpos dependiendo de la región geográfica, motivado probablemente por una conjunción de factores ambientales y genéticos.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Iglesias Gamarra A, Jaramillo Arroyave D, Quintana G, Rondon Herrera F, Mattucci Cerinic M. Historia del compromiso cutáneo de la esclerosis sistémica. *Rev Colomb Reumatol* 2013;20:155–70.
2. Benedek TG, Rodnan GP. The early history and nomenclature of scleroderma and of its differentiation from sclerema neonatorum and scleroedema. *Semin Arthritis Rheum* 1982;12(1):52–67.
3. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet (London, England)* 2017;390(10103):1685–99.
4. Maricq HR, Harper FE, Khan MM, Tan EM, LeRoy EC. Microvascular abnormalities as possible predictors of disease subsets in Raynaud phenomenon and early connective tissue disease. *Clin Exp Rheumatol* 1983;1(3):195–205.
5. Kayser C, Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic sclerosis: unanswered questions. *Front Immunol* 2015;6:167.
6. Nihtyanova SI, Denton CP. Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010;6(2):112–6.
7. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35(1):35–42.
8. Hamaguchi Y. Autoantibody profiles in systemic sclerosis: predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol* 2010;37(1):42–53.
9. Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German Network for Systemic Scleroderma: correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Res Ther* 2011;13(5):R172.

## Bibliografía

10. Nihtyanova SI, Tang EC, Coghlan JG, Wells AU, Black CM, Denton CP. Improved survival in systemic sclerosis is associated with better ascertainment of internal organ disease: a retrospective cohort study. *QJM* 2010;103(2):109–15.
11. Poole JL, Steen VD. The use of the Health Assessment Questionnaire (HAQ) to determine physical disability in systemic sclerosis. *Arthritis Care Res* 1991;4(1):27–31.
12. Jaeger VK, Distler O, Maurer B, et al. Functional disability and its predictors in systemic sclerosis: a study from the DeSSciper project within the EUSTAR group. *Rheumatology (Oxford)* 2018;57(3):441–50.
13. Sierra-Sepulveda A, Esquinca-Gonzalez A, Benavides-Suarez SA, et al. Systemic Sclerosis Pathogenesis and Emerging Therapies, beyond the Fibroblast. *Biomed Res Int* 2019;2019:4569826.
14. Denton CP. Advances in pathogenesis and treatment of systemic sclerosis. *Clin Med* 2016;16(1):55–60.
15. Liu M, Wu W, Sun X, et al. New insights into CD4(+) T cell abnormalities in systemic sclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016;28:31–6.
16. Truchetet M-E, Brembilla N-C, Montanari E, et al. Interleukin-17A+ cell counts are increased in systemic sclerosis skin and their number is inversely correlated with the extent of skin involvement. *Arthritis Rheum* 2013;65(5):1347–56.
17. Fujii H, Hasegawa M, Takehara K, Mukaida N, Sato S. Abnormal expression of intracellular cytokines and chemokine receptors in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2002;130(3):548–56.
18. Hasegawa M, Hamaguchi Y, Yanaba K, et al. B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. *Am J Pathol* 2006;169(3):954–66.

19. Arnett FC, Howard RF, Tan F, et al. Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum* 1996;39(8):1362–70.
20. Arnett FC, Reveille JD, Goldstein R, et al. Autoantibodies to fibrillarin in systemic sclerosis (scleroderma). An immunogenetic, serologic, and clinical analysis. *Arthritis Rheum* 1996;39(7):1151–60.
21. Rands AL, Whyte J, Cox B, Hall ND, McHugh NJ. MHC class II associations with autoantibody and T cell immune responses to the scleroderma autoantigen topoisomerase I. *J Autoimmun* 2000;15(4):451–8.
22. Agarwal SK, Tan FK, Arnett FC. Genetics and genomic studies in scleroderma (systemic sclerosis). *Rheum Dis Clin North Am* 2008;34(1):17–40; v.
23. Fanning GC, Welsh KI, Bunn C, Du Bois R, Black CM. HLA associations in three mutually exclusive autoantibody subgroups in UK systemic sclerosis patients. *Br J Rheumatol* 1998;37(2):201–7.
24. Radstake TRDJ, Gorlova O, Rueda B, et al. Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nat Genet* 2010;42(5):426–9.
25. Hudson KL. Genomics, health care, and society. *N Engl J Med* 2011;365(11):1033–41.
26. Jimenez SA. Role of endothelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of the vascular alterations in systemic sclerosis. *ISRN Rheumatol* 2013;2013:835948.
27. Tolosa Vilella C, Simeon Aznar CP, Gabarro Julia L. [Raynaud's phenomenon]. *Med Clin (Barc)* 2009;132(18):712–8.
28. Herrick AL. Pathogenesis of Raynaud's phenomenon. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44(5):587–96.

## Bibliografía

29. Maricq HR, LeRoy EC. Patterns of finger capillary abnormalities in connective tissue disease by “wide-field” microscopy. *Arthritis Rheum* 1973;16(5):619–28.
30. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2013;65(11):2737–47.
31. Maricq HR, LeRoy EC, D’Angelo WA, et al. Diagnostic potential of in vivo capillary microscopy in scleroderma and related disorders. *Arthritis Rheum* 1980;23(2):183–9.
32. Cutolo M, Sulli A, Smith V. Assessing microvascular changes in systemic sclerosis diagnosis and management. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6(10):578–87.
33. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15(2):202–5.
34. LeRoy EC, Medsger TAJ. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001;28(7):1573–6.
35. Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud’s phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2008;58(12):3902–12.
36. Valentini G, Cuomo G, Abignano G, et al. Early systemic sclerosis: assessment of clinical and pre-clinical organ involvement in patients with different disease features. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50(2):317–23.
37. Sáez-Comet L, Simeón-Aznar CP, Pérez-Conesa M, et al. Applying the ACR/EULAR Systemic Sclerosis Classification Criteria to the Spanish

- Scleroderma Registry Cohort. *J Rheumatol* 2015;42(12):2327–31.
38. Trapiella-Martínez L, Díaz-López JB, Caminal-Montero L, et al. Very early and early systemic sclerosis in the Spanish scleroderma Registry (RESCLE) cohort. *Autoimmun Rev* 2017;16(8):796–802.
39. Bellando-Randone S, Matucci-Cerinic M. Very Early Systemic Sclerosis and Pre-systemic Sclerosis: Definition, Recognition, Clinical Relevance and Future Directions. *Curr Rheumatol Rep* 2017;19(10):65.
40. Racine M, Hudson M, Baron M, Nielson WR. The Impact of Pain and Itch on Functioning and Health-Related Quality of Life in Systemic Sclerosis: An Exploratory Study. *J Pain Symptom Manage* 2016;52(1):43–53.
41. Razykov I, Levis B, Hudson M, Baron M, Thombs BD. Prevalence and clinical correlates of pruritus in patients with systemic sclerosis: an updated analysis of 959 patients. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52(11):2056–61.
42. Shand L, Lunt M, Nihtyanova S, et al. Relationship between change in skin score and disease outcome in diffuse cutaneous systemic sclerosis: application of a latent linear trajectory model. *Arthritis Rheum* 2007;56(7):2422–31.
43. Morrisroe KB, Nikpour M, Proudman SM. Musculoskeletal Manifestations of Systemic Sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2015;41(3):507–18.
44. Khanna D, Nagaraja V, Tseng C-H, et al. Predictors of lung function decline in scleroderma-related interstitial lung disease based on high-resolution computed tomography: implications for cohort enrichment in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease trials. *Arthritis Res Ther* 2015;17:372.
45. Khanna D, Tseng C-H, Farmani N, et al. Clinical course of lung physiology in patients with scleroderma and interstitial lung disease: analysis of the Scleroderma Lung Study Placebo Group. *Arthritis Rheum* 2011;63(10):3078–85.

## Bibliografía

46. Goh NSL, Desai SR, Veeraraghavan S, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(11):1248–54.
47. Nihtyanova SI, Schreiber BE, Ong VH, et al. Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* 2014;66(6):1625–35.
48. Shreiner AB, Murray C, Denton C, Khanna D. Gastrointestinal Manifestations of Systemic Sclerosis. *J scleroderma Relat Disord* 2016;1(3):247–56.
49. Lepri G, Guiducci S, Bellando-Randone S, et al. Evidence for oesophageal and anorectal involvement in very early systemic sclerosis (VEDOSS): report from a single VEDOSS/EUSTAR centre. *Ann Rheum Dis* 2015;74(1):124–8.
50. Penn H, Quillinan N, Khan K, et al. Targeting the endothelin axis in scleroderma renal crisis: rationale and feasibility. *QJM* 2013;106(9):839–48.
51. Turk M, Pope JE. The Frequency of Scleroderma Renal Crisis over Time: A Metaanalysis. *J Rheumatol* 2016;43(7):1350–5.
52. Avouac J, Meune C, Chenevier-Gobeaux C, et al. Cardiac biomarkers in systemic sclerosis: contribution of high-sensitivity cardiac troponin in addition to N-terminal pro-brain natriuretic peptide. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2015;67(7):1022–30.
53. Hachulla E, Clerson P, Airò P, et al. Value of systolic pulmonary arterial pressure as a prognostic factor of death in the systemic sclerosis EUSTAR population. *Rheumatology (Oxford)* 2015;54(7):1262–9.
54. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972–2002. *Ann Rheum Dis* 2007;66(7):940–4.
55. Simeón-Aznar CP, Fonollosa-Plá V, Tolosa-Vilella C, et al. Registry of the

- Spanish Network for Systemic Sclerosis: Survival, Prognostic Factors, and Causes of Death. *Medicine (Baltimore)* 2015;94(43):e1728.
56. Pokeerbux MR, Giovannelli J, Dauchet L, et al. Survival and prognosis factors in systemic sclerosis: data of a French multicenter cohort, systematic review, and meta-analysis of the literature. *Arthritis Res Ther* 2019;21(1):86.
57. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeón CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum* 2014;44(2):208–19.
58. Simeón-Aznar CP, Tolosa-Vilella C, Gabarró-Juliá L, et al. Systemic sclerosis sine scleroderma and limited cutaneous systemic sclerosis: similarities and differences. *Clin Exp Rheumatol* 2014;32(6 Suppl 86):S-33-40.
59. Ferri C, Sebastiani M, Lo Monaco A, et al. Systemic sclerosis evolution of disease pathomorphosis and survival. Our experience on Italian patients' population and review of the literature. *Autoimmun Rev* 2014;13(10):1026–34.
60. Pellar RE, Pope JE. Evidence-based management of systemic sclerosis: Navigating recommendations and guidelines. *Semin Arthritis Rheum* 2017;46(6):767–74.
61. Guillevin L, Berezne A, Seror R, et al. Scleroderma renal crisis: a retrospective multicentre study on 91 patients and 427 controls. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51(3):460–7.
62. Senecal J-L, Henault J, Raymond Y. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). *J. Rheumatol.* 2005;32(9):1643–9.
63. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. *J Rheumatol* 1992;19(8):1207–11.



## Bibliografía

64. Hu PQ, Fertig N, Medsger TAJ, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48(5):1363–73.
65. McMahan ZH, Domsic RT, Zhu L, Medsger TA, Casciola-Rosen L, Shah AA. Anti-RNPC3 (U11/U12) antibodies in systemic sclerosis are associated with moderate to severe gastrointestinal dysmotility. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2018;
66. McMahan ZH, Wigley FM, Casciola-Rosen L. Risk of Digital Vascular Events in Scleroderma Patients Who Have Both Anticentromere and Anti-Interferon-Inducible Protein 16 Antibodies. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2017;69(6):922–6.
67. Choi MY, Fritzler MJ. Progress in understanding the diagnostic and pathogenic role of autoantibodies associated with systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2016;28(6):586–94.
68. Fritzler MJ, Choi MY. Editorial: Are Autoantibodies Involved in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis? *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*. 2016;68(9):2067–70.
69. Mihai C, Tervaert JWC. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2010;69(2):319–24.
70. Lewandowska K, Ciurzynski M, Gorska E, et al. Antiendothelial cells antibodies in patients with systemic sclerosis in relation to pulmonary hypertension and lung fibrosis. *Adv Exp Med Biol* 2013;756:147–53.
71. Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 2005;26(11):587–95.
72. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic

- sclerosis. *Arthritis Rheum* 2002;46(6):1602–13.
73. Terrier B, Tamby MC, Camoin L, et al. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients bind to {alpha}-enolase and are associated with interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis* 2010;69(2):428–33.
74. Zhou X, Tan FK, Milewicz DM, Guo X, Bona CA, Arnett FC. Autoantibodies to fibrillin-1 activate normal human fibroblasts in culture through the TGF-beta pathway to recapitulate the “scleroderma phenotype”. *J Immunol* 2005;175(7):4555–60.
75. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354(25):2667–76.
76. Svegliati S, Amico D, Spadoni T, et al. Agonistic Anti-PDGF Receptor Autoantibodies from Patients with Systemic Sclerosis Impact Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Function In Vitro. *Front Immunol* 2017;8:75.
77. Nishijima C, Hayakawa I, Matsushita T, et al. Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2004;138(2):357–63.
78. Rönnblom L, Eloranta M-L. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25(2):248–53.
79. Costa S, Mondini M, Caneparo V, et al. Detection of anti-IFI16 antibodies by ELISA: clinical and serological associations in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50(4):674–81.
80. Stochmal A, Czuwara J, Trojanowska M, Rudnicka L. Antinuclear Antibodies in Systemic Sclerosis: an Update. *Clin Rev Allergy Immunol* 2019;
81. COONS AH, KAPLAN MH. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp*

## Bibliografía

- Med 1950;91(1):1–13.
82. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73(1):17–23.
  83. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1601–11.
  84. Kivity S, Gilburd B, Agmon-Levin N, et al. A novel automated indirect immunofluorescence autoantibody evaluation. *Clin Rheumatol* 2012;31(3):503–9.
  85. Damoiseaux J, Andrade LEC, Carballo OG, et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Ann Rheum Dis* 2019;78(7):879–89.
  86. Dellavance A, Gallindo C, Soares MG, da Silva NP, Mortara RA, Andrade LEC. Redefining the Scl-70 indirect immunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific compound immunofluorescence pattern. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(6):632–7.
  87. Johnson SR, Fransen J, Khanna D, et al. Validation of potential classification criteria for systemic sclerosis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64(3):358–67.
  88. Betteridge Z, McHugh N. Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis. *J Intern Med* 2016;280(1):8–23.
  89. Mahler M, Fritzler MJ, Satoh M. Autoantibodies to the mitochondrial RNA processing (MRP) complex also known as Th/To autoantigen. *Autoimmun Rev* 2015;14(3):254–7.
  90. Mahler M, Raijmakers R. Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmun Rev* 2007;6(7):432–7.
  91. Okano Y, Steen VD, Medsger TAJ. Autoantibody to U3 nucleolar

- ribonucleoprotein (fibrillarín) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1992;35(1):95–100.
92. Tormey VJ, Bunn CC, Denton CP, Black CM. Anti-fibrillarín antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(10):1157–62.
93. Fujii T, Mimori T, Akizuki M. Detection of autoantibodies to nucleolar transcription factor NOR 90/hUBF in sera of patients with rheumatic diseases, by recombinant autoantigen-based assays. *Arthritis Rheum* 1996;39(8):1313–8.
94. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M. Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1993;91(4):1399–404.
95. Damoiseaux J, Boesten K, Giesen J, Austen J, Tervaert JWC. Evaluation of a novel line-blot immunoassay for the detection of antibodies to extractable nuclear antigens. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:340–7.
96. Skare TL, Nisihara RM, Haider O, Azevedo PM, Utiyama SRR. Liver autoantibodies in patients with scleroderma. *Clin Rheumatol* 2011;30(1):129–32.
97. EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol* 2017;67(1):145–72.
98. Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, et al. High incidence of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis patients with anti-centriole autoantibodies. *Mod Rheumatol* 2015;25(5):798–801.
99. Szalat R, Ghillani-Dalbin P, Jallouli M, et al. Anti-NuMA1 and anti-NuMA2 (anti-HsEg5) antibodies: Clinical and immunological features: A propos of 40 new cases and review of the literature. *Autoimmun Rev* 2010;9(10):652–6.
100. de Almeida Brito F, Maria Eloi Santos S, Aparecida Ferreira G, et al. Diagnostic Evaluation of ELISA and Chemiluminescent Assays as Alternative Screening

## Bibliografía

- Tests to Indirect Immunofluorescence for the Detection of Antibodies to Cellular Antigens. *Am J Clin Pathol* 2016;145(3):323–31.
101. Murdjeva MA, Ryasheva NP, Draganov MM, Paunov LD. A comparative study of immunological methods for determination of serum antinuclear antibodies. *Folia Med (Plovdiv)* 2011;53(4):21–7.
  102. Lin A V. Direct ELISA. *Methods Mol Biol* 2015;1318:61–7.
  103. Lin A V. Indirect ELISA. *Methods Mol Biol* 2015;1318:51–9.
  104. Patterson KA, Roberts-Thomson PJ, Lester S, et al. Interpretation of an Extended Autoantibody Profile in a Well-Characterized Australian Systemic Sclerosis (Scleroderma) Cohort Using Principal Components Analysis. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* 2015;67(12):3234–44.
  105. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 2012;4(9):429–34.
  106. Corthell JT. Chapter 8 - Immunoprecipitation [Internet]. In: Corthell Tricks, and Pitfalls JTBT-BMP in NT, editor. . San Diego: Academic Press; 2014. p. 77–81. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128014615000083>
  107. Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, Steigerwald J, Tan EM. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(3):1627–31.
  108. Saito A, Muro Y, Sugiura K, Akiyama M. Low prevalence of autoantibodies to CENP-H, -I, -K, -L, -M, -N, -T and -U in a Japanese cohort of anti-centromere positive samples. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2013;35(1):57–63.
  109. Iniesta Arandia N, Simeon-Aznar CP, Guillen Del Castillo A, et al. Influence of antibody profile in clinical features and prognosis in a cohort of Spanish patients

- with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2017;35 Suppl 1(4):98–105.
110. Hoffmann-Vold A-M, Molberg O, Midtvedt O, Garen T, Gran JT. Survival and causes of death in an unselected and complete cohort of Norwegian patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2013;40(7):1127–33.
  111. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore)* 2002;81(2):139–53.
  112. Douvas AS, Achten M, Tan EM. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem* 1979;254(20):10514–22.
  113. Reveille JD, Solomon DH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;49(3):399–412.
  114. Weiner ES, Hildebrandt S, Senecal JL, et al. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum* 1991;34(1):68–77.
  115. Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis* 2007;66(6):754–63.
  116. Okano Y, Steen VD, Medsger TAJ. Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1993;119(10):1005–13.
  117. Satoh M, Kuwana M, Ogasawara T, et al. Association of autoantibodies to topoisomerase I and the phosphorylated (HIO) form of RNA polymerase II in Japanese scleroderma patients. *J Immunol* 1994;153(12):5838–48.
  118. Meyer OC, Fertig N, Lucas M, Somogyi N, Medsger TAJ. Disease subsets,

## Bibliografía

- antinuclear antibody profile, and clinical features in 127 French and 247 US adult patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2007;34(1):104–9.
119. Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Tojo T, Medsger TAJ. Racial differences in the distribution of systemic sclerosis-related serum antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1994;37(6):902–6.
120. Bose N, Chiesa-Vottero A, Chatterjee S. Scleroderma renal crisis. *Semin Arthritis Rheum* 2015;44(6):687–94.
121. Moinzadeh P, Fonseca C, Hellmich M, et al. Association of anti-RNA polymerase III autoantibodies and cancer in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2014;16(1):R53.
122. Shah AA, Rosen A, Hummers L, Wigley F, Casciola-Rosen L. Close temporal relationship between onset of cancer and scleroderma in patients with RNA polymerase I/III antibodies. *Arthritis Rheum* 2010;62(9):2787–95.
123. Wolfe JF, Adelstein E, Sharp GC. Antinuclear antibody with distinct specificity for polymyositis. *J Clin Invest* 1977;59(1):176–8.
124. D’Aoust J, Hudson M, Tatibouet S, et al. Clinical and serologic correlates of anti-PM/Scl antibodies in systemic sclerosis: a multicenter study of 763 patients. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* 2014;66(6):1608–15.
125. Guillen-Del Castillo A, Pilar Simeon-Aznar C, Fonollosa-Pla V, et al. Good outcome of interstitial lung disease in patients with scleroderma associated to anti-PM/Scl antibody. *Semin Arthritis Rheum* 2014;44(3):331–7.
126. Koschik RW 2nd, Fertig N, Lucas MR, Domsic RT, Medsger TAJ. Anti-PM-Scl antibody in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30(2 Suppl 71):S12-6.
127. Bernal-Bello D, de Tena JG, Guillén-Del Castillo A, et al. Novel risk factors related to cancer in scleroderma. *Autoimmun Rev* 2017;16(5):461–8.

128. Kuwana M. Circulating Anti-Nuclear Antibodies in Systemic Sclerosis: Utility in Diagnosis and Disease Subsetting. *J Nippon Med Sch* 2017;84(2):56–63.
129. Aggarwal R, Lucas M, Fertig N, Oddis C V, Medsger TAJ. Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2009;60(4):1112–8.
130. Steen V, Domsic RT, Lucas M, Fertig N, Medsger TAJ. A clinical and serologic comparison of African American and Caucasian patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2012;64(9):2986–94.
131. Steen V. Predictors of end stage lung disease in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(2):97–9.
132. Nishimagi E, Tochimoto A, Kawaguchi Y, et al. Characteristics of patients with early systemic sclerosis and severe gastrointestinal tract involvement. *J Rheumatol* 2007;34(10):2050–5.
133. Reddy R, Tan EM, Henning D, Nohga K, Busch H. Detection of a nucleolar 7-2 ribonucleoprotein and a cytoplasmic 8-2 ribonucleoprotein with autoantibodies from patients with scleroderma. *J Biol Chem* 1983;258(3):1383–6.
134. Hashimoto C, Steitz JA. Sequential association of nucleolar 7-2 RNA with two different autoantigens. *J Biol Chem* 1983;258(3):1379–82.
135. Okano Y, Medsger TAJ. Autoantibody to Th ribonucleoprotein (nucleolar 7-2 RNA protein particle) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33(12):1822–8.
136. Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 1981;68(3):611–20.
137. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. The mechanism of vertebrate



## Bibliografía

- nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)* 2004;3(8–9):817–26.
138. Lakota K, Thallinger GG, Sodin-Semrl S, et al. International cohort study of 73 anti-Ku-positive patients: association of p70/p80 anti-Ku antibodies with joint/bone features and differentiation of disease populations by using principal-components analysis. *Arthritis Res Ther* 2012;14(1):R2.
139. Hoa S, Hudson M, Troyanov Y, et al. Single-specificity anti-Ku antibodies in an international cohort of 2140 systemic sclerosis subjects: clinical associations. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(35):e4713.
140. Rozman B, Cucnik S, Sodin-Semrl S, et al. Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in patients with systemic sclerosis: a European EUSTAR-initiated multi-centre case-control study. *Ann Rheum Dis* 2008;67(9):1282–6.
141. Rigolet A, Musset L, Dubourg O, et al. Inflammatory myopathies with anti-Ku antibodies: a prognosis dependent on associated lung disease. *Medicine (Baltimore)* 2012;91(2):95–102.
142. Cavazzana I, Ceribelli A, Quinzanini M, et al. Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in systemic autoimmune diseases. *Lupus* 2008;17(8):727–32.
143. Pettersson I, Hinterberger M, Mimori T, Gottlieb E, Steitz JA. The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins. Identification of multiple protein components reactive with anti-(U1)ribonucleoprotein and anti-Sm autoantibodies. *J Biol Chem* 1984;259(9):5907–14.
144. Maddison PJ. Mixed connective tissue disease: overlap syndromes. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 2000;14(1):111–24.
145. Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, et al. The clinical relevance of serum

- antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2008;158(3):487–95.
146. Rodriguez-Sanchez JL, Gelpi C, Juarez C, Hardin JA. Anti-NOR 90. A new autoantibody in scleroderma that recognizes a 90-kDa component of the nucleolus-organizing region of chromatin. *J Immunol* 1987;139(8):2579–84.
147. Chan EK, Imai H, Hamel JC, Tan EM. Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. *J Exp Med* 1991;174(5):1239–44.
148. Wielosz E, Dryglewska M, Majdan M. Serological profile of patients with systemic sclerosis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2014;68:987–91.
149. Dagher JH, Scheer U, Voit R, et al. Autoantibodies to NOR 90/hUBF: longterm clinical and serological followup in a patient with limited systemic sclerosis suggests an antigen driven immune response. *J Rheumatol* 2002;29(7):1543–7.
150. Gilliam AC, Steitz JA. Rare scleroderma autoantibodies to the U11 small nuclear ribonucleoprotein and to the trimethylguanosine cap of U small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(14):6781–5.
151. Shah AA, Xu G, Rosen A, et al. Brief Report: Anti-RNPC-3 Antibodies As a Marker of Cancer-Associated Scleroderma. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* 2017;69(6):1306–12.
152. Fertig N, Domsic RT, Rodriguez-Reyna T, et al. Anti-U11/U12 RNP antibodies in systemic sclerosis: a new serologic marker associated with pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009;61(7):958–65.
153. Zaarur N, Xu X, Lestienne P, et al. RuvbL1 and RuvbL2 enhance aggresome formation and disaggregate amyloid fibrils. *EMBO J* 2015;34(18):2363–82.

## Bibliografía

154. Pauling JD, Salazar G, Lu H, et al. Presence of anti-eukaryotic initiation factor-2B, anti-RuvBL1/2 and anti-synthetase antibodies in patients with anti-nuclear antibody negative systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2018;57(4):712–7.
155. Kaji K, Fertig N, Medsger TAJ, et al. Autoantibodies to RuvBL1 and RuvBL2: a novel systemic sclerosis-related antibody associated with diffuse cutaneous and skeletal muscle involvement. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2014;66(4):575–84.
156. Pavitt GD. eIF2B, a mediator of general and gene-specific translational control. *Biochem Soc Trans* 2005;33(Pt 6):1487–92.
157. Betteridge ZE, Woodhead F, Lu H, et al. Brief Report: Anti-Eukaryotic Initiation Factor 2B Autoantibodies Are Associated With Interstitial Lung Disease in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* 2016;68(11):2778–83.
158. Frech TM, Machin DR, Murtaugh MA, et al. Implications of endothelial shear stress on systemic sclerosis vasculopathy and treatment. *Clin Exp Rheumatol* 2018;36 Suppl 1(4):175–82.
159. Orlandi M, Barsotti S, Lepri G, et al. One year in review 2018: systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2018;36 Suppl 1(4):3–23.
160. Barsotti S, Bruni C, Orlandi M, et al. One year in review 2017: systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2017;35 Suppl 1(4):3–20.
161. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2003;5(2):80–93.
162. Moinzadeh P, Nihtyanova SI, Howell K, Ong VH, Denton CP. Impact of hallmark autoantibody reactivity on early diagnosis in scleroderma. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;43(3):249–55.
163. Motegi S-I, Toki S, Yamada K, Uchiyama A, Ishikawa O. Demographic and

- clinical features of systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase III antibodies. *J Dermatol* 2015;42(2):189–92.
164. Airo' P, Ceribelli A, Cavazzana I, Taraborelli M, Zingarelli S, Franceschini F. Malignancies in Italian patients with systemic sclerosis positive for anti-RNA polymerase III antibodies. *J Rheumatol* 2011;38(7):1329–34.
165. Sobanski V, Dauchet L, Lefèvre G, et al. Prevalence of anti-RNA polymerase III antibodies in systemic sclerosis: New data from a French cohort and a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* 2014;66(2):407–17.
166. Bardoni A, Rossi P, Salvini R, Bobbio-Pallavicini F, Caporali R, Montecucco C. Autoantibodies to RNA-polymerases in Italian patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(3):301–6.
167. Faucher B, Stein P, Granel B, et al. Low prevalence of anti-RNA polymerase III antibodies in a French scleroderma population: anti-RNA polymerase III scleroderma. *Eur J Intern Med* 2010;21(2):114–7.
168. Meyer O, De Chaisemartin L, Nicaise-Roland P, et al. Anti-RNA polymerase III antibody prevalence and associated clinical manifestations in a large series of French patients with systemic sclerosis: a cross-sectional study. *J Rheumatol* 2010;37(1):125–30.
169. Morozzi G, Bellisai F, Fineschi I, et al. Prevalence of anti-histone antibodies, their clinical significance and correlation with other autoantibodies in a cohort of Italian scleroderma patients. *Auto-Immun highlights* 2011;2(1):29–33.
170. Penn H, Howie AJ, Kingdon EJ, et al. Scleroderma renal crisis: patient characteristics and long-term outcomes. *QJM* 2007;100(8):485–94.
171. Terras S, Hartenstein H, Höxtermann S, Gambichler T, Kreuter A. RNA polymerase III autoantibodies may indicate renal and more severe skin

## Bibliografía

- involvement in systemic sclerosis. *Int J Dermatol* 2016;55(8):882–5.
172. Nikpour M, Hissaria P, Byron J, et al. Prevalence, correlates and clinical usefulness of antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis: a cross-sectional analysis of data from an Australian cohort. *Arthritis Res Ther* 2011;13(6):R211.
  173. Ceribelli A, Cavazzana I, Airò P, Franceschini F. Anti-RNA polymerase III antibodies as a risk marker for early gastric antral vascular ectasia (GAVE) in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2010;37(7):1544.
  174. Ghrénassia E, Avouac J, Khanna D, et al. Prevalence, correlates and outcomes of gastric antral vascular ectasia in systemic sclerosis: a EUSTAR case-control study. *J Rheumatol* 2014;41(1):99–105.
  175. Simeón-Aznar CP, Fonollosa-Plá V, Tolosa-Vilella C, et al. Registry of the Spanish network for systemic sclerosis: clinical pattern according to cutaneous subsets and immunological status. *Semin Arthritis Rheum* 2012;41(6):789–800.
  176. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Accardo S. Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000;27(1):155–60.
  177. 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(3):302–12.
  178. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): *Endo. Eur Heart J* 2016;37(1):67–119.
  179. Guillén-Del Castillo A, Callejas-Moraga EL, García G, et al. High sensitivity and

- negative predictive value of the DETECT algorithm for an early diagnosis of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: application in a single center. *Arthritis Res Ther* 2017;19(1):135.
180. Hudson M, Pope J, Mahler M, et al. Clinical significance of antibodies to Ro52/TRIM21 in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2012;14(2):R50.
181. Jacobsen S, Ullman S, Shen GQ, Wiik A, Halberg P. Influence of clinical features, serum antinuclear antibodies, and lung function on survival of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001;28(11):2454–9.
182. Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, Wiik A, Akesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(4):534–40.
183. Chang WSJ, Schollum J, White DHN, Solanki KK. A cross-sectional study of autoantibody profiles in the Waikato systemic sclerosis cohort, New Zealand. *Clin Rheumatol* 2015;34(11):1921–7.
184. Bossini-Castillo L, López-Isac E, Mayes MD, Martín J. Genetics of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* 2015;37(5):443–51.
185. Müller C de S, Paiva EDS, Azevedo VF, Radominski SC, Lima Filho JHC. Autoantibody profile and clinical correlation in a group of patients with systemic sclerosis in southern Brazil. *Rev Bras Reumatol* 2011;51(4):314-318,323-324.
186. Hung EW, Mayes MD, Sharif R, et al. Gastric antral vascular ectasia and its clinical correlates in patients with early diffuse systemic sclerosis in the SCOT trial. *J Rheumatol* 2013;40(4):455–60.
187. Serling-Boyd N, Chung MP-S, Li S, et al. Gastric Antral Vascular Ectasia in Systemic Sclerosis: Association with Anti-RNA Polymerase III and Negative Anti-Nuclear Antibodies. *Semin Arthritis Rheum* [Internet] 2020; Available from:

## Bibliografía

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049017220301955>
188. Vanthuyne M, Smith V, De Langhe E, et al. The Belgian Systemic Sclerosis Cohort: correlations between disease severity scores, cutaneous subsets, and autoantibody profile. *J Rheumatol* 2012;39(11):2127–33.
  189. Kuwana M, Okano Y, Pandey JP, Silver RM, Fertig N, Medsger TAJ. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-RNA polymerase III antibody: analytical accuracy and clinical associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2005;52(8):2425–32.
  190. Hoffmann-Vold A-M, Midtvedt Ø, Tennøe AH, et al. Cardiopulmonary Disease Development in Anti-RNA Polymerase III-positive Systemic Sclerosis: Comparative Analyses from an Unselected, Prospective Patient Cohort. *J Rheumatol* 2017;44(4):459–65.
  191. Shah AA, Rosen A. Cancer and systemic sclerosis: novel insights into pathogenesis and clinical implications. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23(6):530–5.
  192. Igusa T, Hummers LK, Visvanathan K, et al. Autoantibodies and scleroderma phenotype define subgroups at high-risk and low-risk for cancer. *Ann Rheum Dis* 2018;77(8):1179–86.
  193. Watad A, McGonagle D, Bragazzi NL, et al. Autoantibody status in systemic sclerosis patients defines both cancer risk and survival with ANA negativity in cases with concomitant cancer having a worse survival. *Oncoimmunology* 2019;8(6):e1588084.
  194. Gauderon A, Roux-Lombard P, Spoerl D. Antinuclear Antibodies With a Homogeneous and Speckled Immunofluorescence Pattern Are Associated With Lack of Cancer While Those With a Nucleolar Pattern With the Presence of Cancer. *Front Med* 2020;7:165.

195. Joseph CG, Darrah E, Shah AA, et al. Association of the autoimmune disease scleroderma with an immunologic response to cancer. *Science* 2014;343(6167):152–7.
196. Lazzaroni M-G, Cavazzana I, Colombo E, et al. Malignancies in Patients with Anti-RNA Polymerase III Antibodies and Systemic Sclerosis: Analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research Cohort and Possible Recommendations for Screening. *J Rheumatol* 2017;44(5):639–47.
197. Villalta D, Imbustaro T, Di Giovanni S, et al. Diagnostic accuracy and predictive value of extended autoantibody profile in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2012;12(2):114–20.
198. Parker JC, Burlingame RW, Webb TT, Bunn CC. Anti-RNA polymerase III antibodies in patients with systemic sclerosis detected by indirect immunofluorescence and ELISA. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(7):976–9.
199. Domsic RT, Nihtyanova SI, Wisniewski SR, et al. Derivation and validation of a prediction rule for two-year mortality in early diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* 2014;66(6):1616–24.
200. Muangchan C, Baron M, Pope J. The 15% rule in scleroderma: the frequency of severe organ complications in systemic sclerosis. A systematic review. *J Rheumatol* 2013;40(9):1545–56.
201. Rubio-Rivas M, Corbella X, Pestaña-Fernández M, et al. First clinical symptom as a prognostic factor in systemic sclerosis: results of a retrospective nationwide cohort study. *Clin Rheumatol* 2018;37(4):999–1009.





## **10. ANEXO**

Callejas-Moraga EL, Guillén-Del-Castillo A, Marín-Sánchez AM, et al. Clinical features of systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase III antibody in a single centre in Spain. *Clin Exp Rheumatol* 2019;37 Suppl 1(4):41-8

# Clinical features of systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase III antibody in a single centre in Spain

E.L. Callejas-Moraga<sup>1</sup>, A. Guillén-Del-Castillo<sup>2</sup>, A.M. Marín-Sánchez<sup>3</sup>, M. Roca-Herrera<sup>2</sup>, E. Balada<sup>2</sup>, C. Tolosa-Vilella<sup>1</sup>, V. Fonollosa-Pla<sup>2</sup>, C.P. Simeón-Aznar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unit of Systemic Autoimmune Diseases, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Pare Taulí, Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, Barcelona; <sup>2</sup>Unit of Systemic Autoimmune Diseases, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona; <sup>3</sup>Department of Immunology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

Eduardo Luis Callejas-Moraga, MD  
Alfredo Guillén-Del-Castillo, MD, PhD  
Ana María Marín-Sánchez, MD  
María Roca-Herrera, MD  
Eva Balada, MD, PhD  
Carles Tolosa-Vilella, MD, PhD  
Vicente Fonollosa-Pla, MD, PhD  
Carmen P. Simeón-Aznar, MD, PhD

Please address correspondence to:  
Dr Alfredo Guillén-Del-Castillo,  
Department of Systemic Autoimmune  
Diseases, Hospital Universitari Vall  
d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129,  
Barcelona 08035, Spain.  
E-mail: alguille@vhebron.net

Received on August 19, 2018; accepted in  
revised form on October 30, 2018.

Clin Exp Rheumatol 2019; 37 (Suppl. XX):  
S00-S00.

© Copyright CLINICAL AND  
EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2019.

**Key words:** systemic sclerosis,  
autoantibody, anti-RNA polymerase III

**Funding:** This work was funded by Insti-  
tuto de Salud Carlos III, grant P116/02088  
cofinanced by the European Regional  
Development Fund (ERDF).

**Competing interests:** none declared.

## ABSTRACT

**Objective.** To evaluate the clinical features and survival of patients with positive anti-RNA polymerase III (anti-RNAP III) in a Spanish single centre.

**Methods.** We analysed 221 patients with SSc according to LeRoy and Medsger criteria. Twenty-six patients with positivity for anti-RNAP III antibodies were compared with 195 negative patients. Epidemiological, clinical, immunological features and survival were analysed.

**Results.** In patients with anti-RNAP III positivity diffuse cutaneous SSc (dcSSc) subset was the most prevalent (20, 76.9% vs. 35, 17.9%,  $p < 0.001$ ), with shorter diagnosis delay ( $4.11 \pm 7.34$  years vs.  $6.77 \pm 9.22$  years,  $p = 0.005$ ). Patients with anti-RNAP III antibodies had higher frequency of arterial hypertension (13, 50% vs. 55, 28.2%,  $p = 0.024$ ), scleroderma renal crisis (SRC) (3, 11.5% vs. 3, 1.5%,  $p = 0.023$ ), arthritis (9, 34.6% vs. 35, 17.9%,  $p = 0.046$ ), tendon friction rubs (4, 15.4% vs. 1, 0.5%,  $p = 0.001$ ) and contractures (5, 19.2% vs. 10, 5.1%,  $p = 0.02$ ). There were no differences found in the presence of cancer or in global survival. In the multivariate survival analysis, severe interstitial lung disease (ILD) (HR: 8.61, 95%CI 3.40 – 21.81), pulmonary arterial hypertension (PAH) (HR: 4.05, 95%CI 1.42 – 11.61) and SRC (HR: 17.27, 95%CI 3.36 – 88.97) were the only factors associated with poor prognosis.

**Conclusions.** In this cohort anti-RNAP III antibodies are related with dcSSc subset, shorter diagnostic delay and higher prevalence of musculoskeletal involvement, arterial hypertension and SRC. ILD, PAH and SRC were independent prognostic factors.

## Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a multiorgan connective tissue disease of

autoimmune nature characterised by fibrosis of the skin and internal organs, activation of immune system and prominent vascular and microvascular damage and oxidative stress (1, 2). In addition, current investigations support the activation of the immune system plays a crucial role in the pathogenesis of SSc (3, 4). One relevant feature of the immune system activation is the presence of antinuclear antibodies (ANAs) in almost 90% of patients. Moreover, ANAs react against different intracellular components that play crucial roles in transcription, splicing and cell division, leading to the expression of a specific autoantibody (5). The most recent classification criteria developed by the American College of Rheumatology and the European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) include anti-centromere antibodies (ACA), anti-topoisomerase I (ATA) antibodies and anti RNA polymerase III antibodies (anti-RNAP III) (6). ACA are associated with limited cutaneous involvement, pulmonary arterial hypertension (PAH) and more favourable prognosis than patients with other SSc-related ANA (7-9). Anti-topoisomerase I (anti-topo I) are related to diffuse skin involvement and interstitial lung disease (ILD) (8). Anti-RNAP III antibody have been linked to dcSSc subtype (8, 10-12), the development of scleroderma renal crisis (SRC) (10, 12, 13) and gastric antral vascular ectasia (GAVE) (14). In addition presence of anti-RNAP III was associated with the concomitant existence of cancer (14-16).

A recent meta-analysis established an overall prevalence of 11% in SSc patients with a high degree of heterogeneity due to demographic and geographic factors (17). However, few studies have been focused in analysing the characteristics of south European pop-

ulation with positivity for this antibody (15, 18-21).

This study was undertaken to examine the main epidemiological, clinical, immunological, vascular features and survival of SSc patients who were anti-RNAP III positive and compare with anti-RNAP negative in a SSc cohort of a single Spanish centre.

## Methods

### Patients

We selected 221 Caucasian patients (21 men and 192 women) diagnosed with SSc who were assessed in the Scleroderma Unit at Vall d'Hebron Hospital since 1980. The study was approved by the ethics Committee for Clinical Research (PG(AG)07/2015), and all patients provided written informed consent for their participants. All patients met the LeRoy and Medsger criteria (22) and 196 (88.6%) patients fulfilled the 2013 ACR/EULAR classification criteria of SSc (6).

Two hundred and twenty one patients were analysed consecutively. Among them, 26 with anti-RNAP III positivity were compared with 195 patients who were negative for anti-RNAP III.

Age at onset of disease was defined as the presented at first clinical event including the Raynaud's phenomenon (RP), reported by the patient. We also include age at onset of first clinical feature other than RP. Diagnosis delay was defined as the time from the first symptom of the disease (first symptom attributable to the disease including RP or first symptom non-RP) to the time when the diagnosis was established.

Patients were classified according to Leroy and Medsger's subsets (22): limited cutaneous SSc (lcSSc) was defined if skin thickening was confined distally to the elbows and knees and may affect the face; diffuse cutaneous SSc (dcSSc) skin sclerosis also affected proximally to the elbows and knees or the trunk; sine scleroderma SSc (ssSSc) was defined by RP or equivalents (pitting scars, typical capillaroscopic alterations), antinuclear antibodies and scleroderma visceral involvement (PAH, ILD, SRC, oesophageal hypomotility or sclerodermic myocardopathy) without skin sclerosis. Capillaroscopic

study was classified in "early", "active" and "late" pattern according to Cutolo's classification (23). Gastrointestinal involvement was defined as the incompetence of the lower esophageal sphincter (pressure <15mmHg) and esophageal hypomotility, gastroparesis, the presence of gastric antral vascular ectasia (GAVE) (watermelon stomach), or bacterial overgrowth. Liver involvement was determined as elevated liver enzymes without another cause, presence of autoimmune hepatitis or concomitant primary biliary cholangitis (24). PAH was defined as mean pulmonary arterial pressure (mPAP)  $\geq 25$ mmHg in right heart catheterization (RHC) with pulmonary artery wedge pressure (PAWP)  $\leq 15$ mmHg and pulmonary vascular resistance (PVR)  $> 3$  Wood units in RHC (25). Both groups were followed similarly in relation to PAH, based on annual screening through pulmonary function test (PFT), echocardiogram and clinical monitoring (26). ILD was considered if there was radiological evidence of interstitial disease on high resolution computer tomography (HRCT). Heart involvement was defined as a pericardial involvement demonstrated by echocardiogram, computed tomography (CT) or nuclear magnetic resonance (NMR); conduction abnormalities established by electrocardiogram; ischemic heart disease in absence of classical cardiovascular risk factors (CVRF) made evident by left catheterization, NMR or myocardial scintigraphy; scleroderma cardiomyopathy or cardiac fibrosis confirmed by NMR; mitral insufficiency without CVRF and diastolic dysfunction without CVRF proved with echocardiogram as well as left ventricular ejection fraction  $< 50\%$  and right ventricular ejection fraction  $< 40\%$  made evident by echocardiogram or NMR. SRC was defined by the presence of a rapid decline of renal function within an interval of less than one month or by the combination of sudden onset or aggravation of moderate or severe arterial hypertension ( $> 160/90$ mmHg) in association with manifestations of malignant hypertension (27). Cancer data were obtained by pathology report.

Association with other autoantibodies, cancer prevalence, overall survival and survival from the disease onset were analysed.

### Immunological test

Antinuclear autoantibodies (ANAs) were determined by indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. The presence of anti-RNAP III antibodies was detected by commercial line blot assay to RP155 and RP11 proteins (EUROLINE Systemic Sclerosis Profile, Euroimmun, Germany), or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Quanta Lite RNA Pol III, Inova Diagnostics). Using the immunoblot, positive results were considered as determined by the manufacturer; borderline results were taken into account as negative. ELISA test defined a positive result according to manufacturer MBL kit with a cut-off value  $> 28$ UI/mL.

### Statistical analysis

Fisher's exact probability or chi-squared test was used for categorical variables. For continuous variables t-Student test were used. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier curves and log-rank test. Independent risk factors from univariate analyses, at a significance level of 20% were included in the multivariate Cox's regression model.

In one analysis any symptom including RP was considered as de onset of disease, while in another was considered the first symptom-non RP, in both cases reported by patient or doctor. Statistical analysis was accomplished using SPSS Statistics 20.0 (Inc., Chicago, USA). Statistical significance was defined as a *p* value lower than 0.05.

## Results

Of 221 patients included in the study, 26 (11.7%) showed reactivity anti-RNAP III. Twenty-four patients were positive by immunoblot, 22 were RP155+/RP11+, one was RP155+/RP11- and another was RP155-/RP11+ (the latter was also positive by ELISA). Among these 24 patients diagnosed by immunoblot, a total of 4 patients were positive also by ELISA. In addition, 2 more patients were anti-RNAP



Table I. Demographic and clinical characteristics of 221 SSc patients, with and without anti-RNAP III reactivity.

Demographic and clinical characteristics, n (%)	Overall SSc 221 (100)	Anti-RNAP III positive 26 (11.8)	Anti-RNAP III negative 195 (88.2)	<i>p</i>
Female gender, n (%)	192 (86.9)	21 (80.8)	171 (87.7)	0.350
<b>SSc subsets (N=221)</b>				
Limited cutaneous SSc, n (%)	137 (62)	6 (23.1)	131 (67.2)	<b>&lt;0.001</b>
Sine escleroderma SSc, n (%)	29 (13.1)	0 (0)	29 (14.9)	<b>0.030</b>
Diffuse cutaneous SSc, n (%)	55 (24.9)	20 (76.9)	35 (17.9)	<b>&lt;0.001</b>
Age at disease onset, mean ± SD, y	40.5 ± 15.6	38.3 ± 14.0	40.8 ± 15.8	0.580
Age at onset of first non-RP symptom, mean ± SD, y	45.3 ± 14.8	41.0 ± 15.5	45.8 ± 14.7	0.223
Age at SSc diagnosis, mean ± SD, y	46.9 ± 15.6	42.4 ± 15.6	47.4 ± 15.5	0.170
Diagnosis delay since first symptom, mean ± SD, y	6.3 ± 9.0	4.11 ± 7.3	6.8 ± 9.2	<b>0.005</b>
Diagnosis delay since non RP symptom, mean ± SD, y	2.0 ± 5.1	1.4 ± 2.6	2.0 ± 5.4	0.205
Time of follow-up since first symptom, mean ± SD, y	18.7 ± 12.1	16.2 ± 10.5	19.1 ± 12.3	0.268
Time of follow-up since first non RP symptom, mean ± SD, y	13.9 ± 9.3	13.4 ± 9.2	14.0 ± 9.4	0.765
Patients who met 2013 ACR/EULAR criteria, n (%)	196 (88.69)	26 (100)	170 (87.1)	0.051
Cutolo late pattern, n (%)	55/209 (26.3)	6/23 (26.1)	49/186 (26.3)	0.979
<b>Cardiovascular risk factors</b>				
Arterial hypertension, n (%)	68/221 (30.8)	13/26 (50)	55/195 (28.2)	<b>0.024</b>
Diabetes Mellitus, n (%)	11/221 (5)	1/26 (3.8)	10/195 (5.1)	1.000
Dyslipidemia, n (%)	47/221 (21.3)	6/26 (23.1)	41/195 (21)	0.810
<b>Peripheral vascular manifestations, n (%)</b>				
Raynaud's phenomenon, n (%)	220/221 (99.5)	26/26 (100)	194/195 (99.5)	0.710
Digital ulcers, n (%)	216/221 (97.7)	26/26 (100)	190/195 (97.4)	1.000
Digital ulcers, n (%)	115/221 (52)	16/26 (61.5)	99/195 (50.8)	0.302
Telangiectasias, n (%)	166/221 (75.1)	20/26 (76.9)	146/195 (74.9)	0.820
<b>Gastrointestinal involvement, n (%)</b>				
Esophagus involvement, n (%)	192/221 (86.9)	23/26 (88.5)	169/195 (86.7)	1.000
Stomach involvement, n (%)	181/221 (81.9)	20/26 (76.9)	161/195 (82.6)	0.587
GAVE, n (%)	41/221 (18.8)	8/26 (30.8)	33/195 (16.9)	0.106
Intestinal involvement, n (%)	15/112 (13.4)	2/15 (13.3)	13/97 (13.4)	1.000
Liver involvement, n (%)	37/221 (16.7)	6/26 (23.1)	31/195 (15.9)	0.400
Liver involvement, n (%)	17/221 (7.7)	2/26 (7.7)	15/195 (7.7)	0.679
<b>Lung involvement (ILD and/or PAH)</b>				
Lung involvement (ILD and/or PAH)	109/221 (49.3)	15/26 (57.7)	94/195 (48.2)	0.363
Interstitial lung disease, n (%)	96/221 (43.4)	14/26 (53.8)	82/195 (42.1)	0.505
Pulmonary arterial hypertension, n (%)	26/221 (11.8)	3/26 (11.5)	23/195 (11.8)	1.000
FVC < 70%, n (%)	74/221 (33.8)	9/26 (36.0)	65/195 (33.5)	0.804
FVC < 50%, n (%)	22/221 (10.0)	2/26 (8.0)	20/195 (10.3)	1.000
<b>Heart involvement, n (%)</b>				
Heart involvement, n (%)	169/221 (76.5)	19/26 (73.1)	150/195 (76.9)	0.664
LVEF < 50%, n (%)	7/221 (3.2)	0/26 (0)	7/195 (3.6)	1.000
Pericarditis, n (%)	23/221 (13.1)	5/26 (19.2)	24/195 (12.3)	0.352
Coronary heart disease, n (%)	4/221 (1.8)	0/26 (0)	4/195 (2.1)	1.000
Coronary microvascular disease, n (%)	17/221 (7.7)	3/26 (11.5)	14/195 (7.2)	0.431
LV diastolic dysfunction, n (%)	101/221 (47.4)	11/26 (44)	89/195 (47.9)	0.716
Mitral insufficiency, n (%)	127/221 (59.6)	14/26 (53.8)	112/195 (60.1)	0.694
Conduction abnormalities, n (%)	50/221 (34)	6/26 (35.3)	44/195 (33.8)	0.906
Myocardial fibrosis, n (%)	4/221 (1.8)	1/26 (3.8)	3/195 (1.5)	0.396
<b>Renal involvement</b>				
Scleroderma renal crisis, n (%)	6/221 (2.7)	3/26 (11.5)	3/195 (1.5)	<b>0.023</b>
<b>Musculoskeletal involvement, n (%)</b>				
Musculoskeletal involvement, n (%)	107/221 (48.4)	16/26 (61.5)	91/195 (46.7)	0.150
Arthritis, n (%)	44/221 (19.4)	9/26 (34.6)	35/195 (17.9)	<b>0.046</b>
Tendon friction rubs, n (%)	5/221 (2.3)	4/26 (15.4)	1/195 (0.5)	<b>0.001</b>
Contractures, n (%)	15/221 (6.8)	5/26 (19.2)	10/195 (5.1)	<b>0.020</b>
Myositis, n (%)	13/221 (5.9)	0/26 (0)	13/195 (6.7)	0.373
Non-inflammatory myopathy, n (%)	16/221 (7.2)	1/26 (3.8)	15/195 (7.7)	0.701
Calcinosis, n (%)	54/221 (24.4)	7/26 (26.9)	47/195 (24.1)	0.753
Cancer	25/221 (11.3)	4/26 (15.4)	21/195 (10.8)	0.508
<b>Causes of death</b>				
Total, n (%)	29/221 (13.1)	4/26 (15.4)	25/195 (12.8)	0.757
<b>SSc related:</b>				
ILD or PAH, n (%)	12/29 (41.3)	3/4 (75)	9/25 (36)	0.126
Cardiopathy, n (%)	3/29 (10.3)	0/4 (0)	3/25 (12)	1.000
Scleroderma renal crisis, n (%)	1/29 (3.4)	0/4 (0)	1/25 (4)	1.000
<b>Non SSc-related</b>				
Non SSc-related	13/29 (44.8)	1/4 (25)	12/25 (48)	0.900

SSc: systemic sclerosis; anti-RNAP III: anti-RNA polymerase III; y: years; RP: Raynaud's phenomenon; GAVE: gastric antral vascular ectasia; ILD: interstitial lung disease; PAH: pulmonary arterial hypertension; FVC: Forced Vital Capacity; LVEF: left ventricle ejection fraction; LV: left ventricle; bold *p*: *p*<0.05.

**Table II.** Immunological features of 221 SSc patients with and without anti-RNAP III reactivity.

	Overall SSc 221 (100)	Anti-RNAP III positive 26 (11.8)	Anti-RNAP III negative 195 (88.2)	<i>p</i>
Anti-nuclear, n (%)	217 (98.2)	26 (100)	191 (97.9)	1.000
Anti-centromere, n (%)	77 (34.8)	0 (0)	77 (39.5)	<b>&lt;0.001</b>
Anti-topoisomerase, n (%)	49 (22.2)	3 (11.5)	46 (23.6)	0.165
Anti-PM/Scl, n (%)	17 (7.7)	0 (0)	17 (8.7)	0.230
Anti-RNP, n (%)	6 (2.7)	0 (0)	6 (3.1)	1.000
Anti-Ro52, n (%)	61 (27.6)	3 (11.5)	58 (29.7)	0.051
Anti-Ro60, n (%)	24 (10.9)	2 (7.7)	22 (11.3)	0.740
Anti-La, n (%)	6 (2.7)	1 (3.8)	5 (2.6)	0.530

Bold *p*: *p*<0.05.

III positive by ELISA without having been tested by the immunoblot. The main demographic characteristics, clinical manifestations, immunological features, survival and causes of death are represented in Table I. The female (21, 80.8% and 171, 87.7%) was the most frequent gender in both groups. Patients with anti-RNAP III antibody did not differ from seronegative group in terms of mean age at disease onset (32.2±13.9 years vs. 40.7±15.7 years) or mean age at diagnosis (42.4±15.6 years vs. 47.4±15.5 years). A shorter diagnosis delay in patients with anti-RNAP III was observed (4.1±7.3 years vs. 6.7±9.2 years, *p*=0.005). DcSSc was significantly more frequent in the anti-RNAP III group (20, 76.9% vs. 35, 17.9%, *p*<0.001). The patients anti-RNAP III fulfil more frequently ACR/EULAR 2013 classification criteria (6 (26, 100% vs 170, 87.2%, *p*=0.051).

With reference to traditional cardiovascular risk factors, patients anti-RNAP III presented higher prevalence of arterial hypertension (13, 50% vs. 55, 28.2%, *p*=0.024) with no differences in diabetes mellitus (1, 3.8% vs. 10, 5.1%) or dyslipidaemia (6, 23.1% vs. 41, 21%). RP was less frequently presented as the first manifestation of the disease in the anti-RNAP III group (14, 53.8% vs. 153, 78.5% *p*=0.006). Among peripheral vascular manifestations there were no differences in the presence of digital ulcers (16, 61.5% vs. 99, 50.8%), or in the prevalence RP (26, 100% vs. 190, 97.4%) or telangiectasias (20, 76.9% vs. 146, 74.9%). Neither were there significant differences in the global gastrointestinal involvement (23, 88.5% vs. 169, 86.7%), esophageal (20, 76.9 vs. 161, 82.6%), gastric (8, 30.8% vs. 33, 16.9%), the presence of GAVE (2, 7.7% vs 13,

6.7%), intestinal (6, 23.1% vs. 31, 15.9%) or liver involvement (2, 7.7% vs. 15, 7.7). No differences in lung involvement were found in the form of ILD (14, 53.8% vs. 82, 42.1%) or PAH (3, 11.5% vs. 23, 11.8%). Regarding PFT, there were no differences among patients with forced vital capacity (FVC) below 70% or 50% of predicted (9, 36% vs. 65, 33.5% and 2, 8% vs. 20, 10.3% respectively). No differences in global heart involvement were detected (19, 73.1% vs. 150, 76.9%). Scleroderma renal crisis (SRC) was significantly more frequent in patients with anti-RNAP III (3, 11.5% vs. 3, 1.5% *p*=0.023). Regarding musculoskeletal involvement, arthritis (9, 34.6% vs. 35, 17.9% *p*=0.046), tendon friction rubs (4, 15.4% vs. 1, 0.5% *p*=0.001) and contractures (5, 19.2% vs. 10, 5.1% *p*=0.02) were more frequent in anti-RNAP III group, whereas myositis (0, 0% vs. 13, 6.7%), non-inflammatory myopathy (1, 3.8% vs. 15, 7.7%) and calcinosis (7, 26.9% vs. 47, 24.1%) showed no differences between both groups.

No differences were detected concerning capillaroscopy pattern, late pattern by Cutolo was presented in 55/209 (26.3%) patients (6/23, 26.1 vs. 49/186, 26.3%) (23). In the study of other associated autoantibodies there was only found a not reactivity against anti-centromere antibodies (0, 0% vs. 77, 35.9%, *p*<0.001) in the patients with anti-RNAP III (Table II).

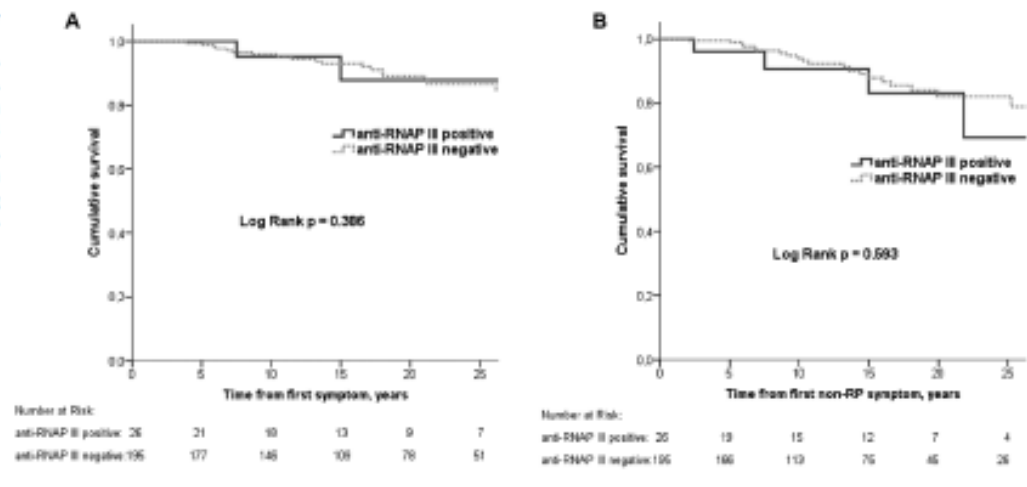
**Table III.** Univariate and multivariate Cox's regression survival analysis.

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
Diffuse cutaneous SSc	2.76	(1.25-6.13)	<b>0.012*</b>	1.36	(0.44-4.22)	0.593
Anti-RNA polymerase III positive	1.59	(0.55-4.60)	0.391			
Anti-centromere positive	0.51	(0.23-1.13)	0.095*	0.94	(0.33-2.66)	0.902
Anti-topoisomerase	1.73	(0.76-3.91)	0.192*	0.80	(0.27-2.66)	0.679
Male	1.45	(0.50-4.20)	0.489			
Age at diagnosis since first symptom	1.11	(1.07-1.14)	<b>&lt;0.001</b>			
Age at diagnosis (since non-RP symptom)	1.05	(1.03-1.09)	<b>&lt;0.001</b>	1.07	(1.04-1.11)	<b>&lt;0.001</b>
ILD with Forced Vital Capacity < 50%	7.06	(3.32-15.01)	<b>&lt;0.001*</b>	8.61	(3.40-21.81)	<b>&lt;0.001</b>
Pulmonary arterial hypertension	2.12	(0.85-5.27)	0.106*	4.05	(1.42-11.61)	<b>0.001</b>
Scleroderma renal crisis	10.47	(3.09-35.43)	<b>&lt;0.001*</b>	17.27	(3.36-88.97)	<b>0.001</b>
Heart involvement	1.12	(0.43-2.95)	0.816			
Cancer	1.40	(0.54-3.68)	0.490			

HR: hazard ratio; CI: confidence interval; bold *p*: *p*<0.05; RP: Raynaud's phenomenon; ILD: interstitial lung disease.  
\*Variables included in the multivariate analysis.



**Fig. 1.** Kaplan-Meier survival plots. Graphic A represents cumulative survival since first SSc symptom. Graphic B shows cumulative survival since first SSc symptom excluding Raynaud's phenomenon.



There were no differences in the presence of cancer in the patients with RNAP III positivity (4, 15.4% vs. 25, 12.8%), although a tendency of higher development of synchronous neoplasms for 60 months prior and after SSc onset was observed (2, 7.7% vs. 7, 3.6%,  $p=0.28$ ). Both groups were followed-up a mean of  $17.8 \pm 12.0$  years with no differences between them, nevertheless there were no differences found in mortality comparing the two groups (4, 15.4% vs. 25, 12.8%), nor in the causes of death. The main causes of death related to SSc were lung disease (ILD or PAH) (3/4, 75% vs. 9/25, 36%), heart disease (0/4, 0% vs. 1/4, 25%) and SRC (0/4, 0% vs. 1/4, 25%). The remaining deceased patient in anti-RNAP III group was because of breast cancer. Other causes in anti-RNAP III negative group were 3 cancer (gastric neoplasm, lung cancer and acute myeloblastic leukemia), one infectious pneumonia, two cases of chronic obstructive pulmonary disease, one chronic pachypleuritis, one intestinal ischaemia, one liver cirrhosis, stroke in two patients and one sudden death. Death data were obtained from local and national records in both groups.

There were no statistical differences in the cumulative survival from the onset of the disease including the RP as first manifestation (log rank  $p=0.386$ , Fig. 1A). Cumulative survival rates from the RP at 5, 10, 15, 20 and 25 years in anti-RNAP III positive group were 100%, 95%, 87%, 87% and 87%, re-

spectively and in seronegative group were 98%, 95%, 93%, 89% and 86%, respectively. Analysing the time from the first non-RP manifestation of SSc, neither were differences found in the survival between patients with anti-RNAP III antibodies compared with patients without this antibody (Fig. 1B). Cumulative survival rates from the first non-RP symptom at 5, 10, 15, 20 and 25 years in the anti-RNAP III positive group were 96%, 90%, 83%, 83% and 69%, respectively, and in the seronegative group were 98%, 93%, 87%, 82% and 82%, respectively. Univariate Cox survival revealed that dcSSc was associated with a worse survival (hazard ratio (HR): 2.76, 95%CI 1.25 – 6.13), as well as ILD with a FVC lower than 50% (HR: 7.06, 95%CI 3.32 – 15.01) and SRC (HR: 10.47, 95%CI 3.09 – 35.43) (Table III). Variables with a  $p < 0.20$  were selected to perform the multivariate Cox's regression survival analysis. Multivariate study showed the presence of ILD with a FVC lower than 50% (HR: 8.61, 95%CI 3.40 – 21.81), PAH (HR: 4.05, 95%CI 1.42 – 11.61) and SRC (HR: 17.27, 95%CI 3.36 – 88.97) were the only factors associated with death during follow-up period (Table III). None of the autoantibodies was associated with a worse outcome.

#### Discussion

In our study, we analysed in a single centre the clinical associations and survival of anti-RNAP III in a SSc Span-

ish cohort. We found an association between anti-RNAP III antibody and shorter diagnosis delay, diffuse cutaneous subtype and more prevalence of arterial hypertension, SRC and some musculoskeletal manifestations such as arthritis, tendon friction rubs and contractures. In reference to overall survival no differences were found in the distinct subgroups analysed. ILD, PAH and SRC were independent prognostic factors.

This study provided new data of anti-RNAP III prevalence in Spanish population in a single centre. We found a prevalence of anti-RNAP III in our cohort of 11.7%, similar to the overall prevalence reported in the last meta-analysis (17). Moreover, it is comparable to that found in southern European countries where prevalence is among 6.6-12.1% (18-21) but lower than described in the United States (24.3%) (15), Canada (18.6%) (28), in northern European countries (21.7-22%) (29, 30) and in New Zealand (20%) (31). Whilst there are different studies that have established the prevalence of anti-RNAP III in Europe (15-19), according to prior literature, this is the first time that it has been described in Spain. The similarity of prevalence between geographically close regions may indicate that there are genetic factors implicated (32) and environmental factors involved may play a role too. The latter is further supported by the comparable prevalence among countries with similar latitude.



Diffuse cutaneous subtype was present in 76.9% of patients, being the most frequent cutaneous subtype in the RNAP-III group, which agrees with other series (56.5-64.3%) (11, 33). With reference to the presence of GAVE there is a disparity between published data. We found a similar prevalence among two groups (13.3% vs. 13.4%) according to Hung *et al.* (35.7% vs. 28.9%) (34). However, EUSTAR study reported significant differences (63% vs. 27%,  $p=0.01$ ) (35).

We observed a higher incidence of musculoskeletal manifestations such as arthritis in the anti-RNAP III group presumably due to the association between antibody expression and diffuse subset. Similarly, there are series in Europe in which this trend is already observed when compared to ACA subset (43.5% vs. 20.1%) (36). In addition, an association has been described between the presence of anti-RNAP III and other connective tissue disease with articular expression mainly as rheumatoid arthritis (11).

We detected that approximately half of patients with anti-RNAP III have ILD, percentage slightly higher than that published in other studies (37-39) but similar to results observed in a Norwegian study (51%) (40). Both studies HRCT was used for ILD diagnosis criteria. In our daily practice we perform a HRCT at the moment of the SSc diagnosis in all patients, then we can detect pulmonary fibrosis in sub-clinical stages. According to the results of HRCT and pulmonary function test, Hoffmann-Vold *et al.* (40) propose to classify patients with anti-RNAP III into two groups at the time of diagnosis. One subset with normal pulmonary findings and low risk to develop ILD and another subset with raised risk in which closer monitoring and early treatment is needed. Furthermore, the same group emphasize that anti-RNAP III was associated with a greater progression of pulmonary fibrosis than in the other subset antibodies. Hoffmann-Vold *et al.* (40) did not find differences in relation to FVC between anti-RNAP III and ATA positive patients. In this same line, we did not find significant differences between anti-RNAP III

positive and negative groups regarding FVC variables, probably due to a low number of ATA in the negative group. Regarding pulmonary vascular disease, in our cohort PAH rates are comparable to those previously reported without establishing association between the presence of the antibody and this complication (7, 15, 20, 38, 40). Most studies did not find any association between anti-RNAP III and PH but only in a few of them this complication was diagnosed by RHC (20, 41). In a multivariable analysis performed in a cohort of about 400 patients it was observed that the anti-RNAP III is an independent predictor of PH measured by RHC (42). Nonetheless, we found that the frequency of PAH was 11.8% in the anti-RNAP III patients, which is similar to the global cohorts, emphasizing that PH surveillance is an important issue in these patients.

SRC is a well-described complication associated in many previous studies with the presence of anti-RNAP III antibodies (7, 43-46). Comparable to most of the previous published data, we found association between presence of anti-RNAP III and renal involvement in form of SRC and arterial hypertension, so it is essential to perform frequent blood pressure controls and blood analysis. It is important to note that, as mentioned before, anti-RNAP patients are a group with an especially high prevalence of tendon friction rubs, contractures and arthritis, which exposes them to a possible greater use of glucocorticoids, so care must be taken given the known relationship between the use of glucocorticoids and SRC (45).

The correlation between anti-RNAP III and cancer is widely known, which has been confirmed in an large study including more than 2100 patients (14), which has also demonstrated a temporal relationship between the onset of SSc and cancer diagnosis (16, 47). Mutations in the polymerase III polypeptide A (*POLR3A*) gene in tumours from SSc patients were found in six of eight patients with anti-RNAP III antibodies suggesting that antigenic trigger is encoded by mutated genes located in tumour cells (48). Moreover, a recent

study by the EUSTAR group proposed a cancer screening program in these patients (49). We detected a similar prevalence of cancer in anti-RNAP III group than previously reported (14, 46) but consistent with other studies recently published, we found no differences compared to those who did not express the antibody (40, 50).

In our present cohort, despite the fact of the long follow-up period, we did not observe differences among overall survival since the first SSc symptom including the RP or from the first clinical feature excluding RP, agreeing with a previous cohort from the north of Europe (51). Multivariate Cox survival analysis confirmed that a worse prognosis was related to developing a SRC, ILD with a FVC lower than 50% of expected or PAH diagnosed by RHC, nevertheless neither dcSSc, anti-RNAP III, anti-Scl 70 nor anti-centromere antibodies were related to a different outcome. To the best of our knowledge this is the first study that defines independent risk factors associated with worse survival in a south European cohort with anti-RNAP III determined. Limitations of our study were different method of anti-RNAP III evaluation since we used ELISA and immunoblot assay, as we have the latter technique available since 2015. However, both techniques have a high sensitivity and specificity when compared with radio-immunoprecipitation method which is considered the gold standard (39, 52, 53). Some of the strengths were the study population was extremely homogenous; the data were collected from a single cohort of patients minimizing the inter-observer variability of the clinical findings, the performance of a complementary test or even giving a similar interpretation of results and that we defined the risk factors associated with worse survival.

## Conclusions

The anti-RNAP III antibody is included in the last ACR/EULAR classification criteria and this positivity may have diagnostic and prognostic implications and can lead the clinician to take decisions to prevent certain conditions. To our knowledge this is the first study fo-



cusing on the prevalence of anti-RNAP III in the Spanish population and their clinical, epidemiological and microvascular characteristics as well as survival analysis. We found that the group anti-RNAP III had more prevalence of dcSSc, shorter diagnosis delay, less frequency of RP as the first SSc manifestation, and increased prevalence of SRC and arterial hypertension. The analysis of anti-RNAP III antibody in SSc patients is useful, since its association with potentially serious manifestations is clear.

## References

- DENTON CP, KHANNA D: Systemic sclerosis. *Lancet* 2017; 390: 1685-99.
- FRECH TM, MACHIN DR, MURTAUGH MA et al: Implications of endothelial shear stress on systemic sclerosis vasculopathy and treatment. *Clin Exp Rheumatol* 2018; 36 (Suppl. 113): S175-82.
- ORLANDI M, BARSOTTI S, LEPRI G et al: One year in review 2018: systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2018; 36 (Suppl. 113): S3-23.
- BARSOTTI S, BRUNI C, ORLANDI M et al: One year in review 2017: Systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35 (Suppl. 106): S3-20.
- NIHTYANOVA SI, DENTON CP: Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 112-6.
- VAN DEN HOOGEN F, KHANNA D, FRANSEN J et al: 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/european league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 2737-47.
- STEEN VD: Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 35: 35-42.
- HO KT, REVEILLE JD: The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 80-93.
- MOINZADEH P, NIHTYANOVA SI, HOWELL K, ONG VH, DENTON CP: Impact of hallmark autoantibody reactivity on early diagnosis in scleroderma. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012; 43: 249-55.
- BOSE N, CHIESA-VOTTERO A, CHATTERJEE S: Scleroderma renal crisis. *Semin Arthritis Rheum* 2015; 44: 687-94.
- MOTEGI S, TORI S, YAMADA K, UCHIYAMA A, ISHIKAWA O: Demographic and clinical features of systemic sclerosis patients with anti-rna polymerase iii antibodies. *J Dermatol* 2015; 42: 189-92.
- INIESTA ARANDIA N, SIMBON-AZNAR CP, GUILLEN DEL CASTILLO A et al: Influence of antibody profile in clinical features and prognosis in a cohort of spanish patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35 (Suppl. 106): S98-105.
- OKANO Y, STEEN VD, MEDSGER TA Jr: Autoantibody reactive with rna polymerase iii in systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1993; 119: 1005-13.
- MOINZADEH P, FONSECA C, HELLMICH M et al: Association of anti-rna polymerase iii autoantibodies and cancer in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2014; 16: R53.
- AIRO P, CERIBELLI A, CAVAZZANA I, TARABORELLI M, ZINGARELLI S, FRANCESCHINI F: Malignancies in italian patients with systemic sclerosis positive for anti-rna polymerase iii antibodies. *J Rheumatol* 2011; 38: 1329-34.
- SHAH AA, ROSEN A, HUMMERS L, WIGLEY F, CASCIOLA-ROSEN L: Close temporal relationship between onset of cancer and scleroderma in patients with rna polymerase iii antibodies. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 2787-95.
- SOBANSKI V, DAUCHET L, LEFEVRE G et al: Prevalence of anti-rna polymerase iii antibodies in systemic sclerosis: New data from a french cohort and a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 407-17.
- BARIONI A, ROSSI P, SALVINI R, BOBBIO-PALLAVICINI F, CAPORALI R, MONTECUCCO C: Autoantibodies to RNA-polymerases in italian patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21: 301-6.
- FAUCHER B, STEIN P, GRANEL B et al: Low prevalence of anti-rna polymerase iii antibodies in a french scleroderma population: Anti-rna polymerase iii scleroderma. *Eur J Intern Med* 2010; 21: 114-7.
- MEYER O, DE CHAISEMARTIN L, NICAISE-ROLAND P et al: Anti-rna polymerase iii antibody prevalence and associated clinical manifestations in a large series of french patients with systemic sclerosis: A cross-sectional study. *J Rheumatol* 2010; 37: 125-30.
- MOROZZI G, BELLISAI F, FINESCHI I et al: Prevalence of anti-histone antibodies, their clinical significance and correlation with other autoantibodies in a cohort of italian scleroderma patients. *Auto Immun Highlights* 2011; 2: 29-33.
- LEROY EC, MEDSGER TA, Jr: Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001; 28: 1573-6.
- CUTOLO M, SULLI A, PIZZORNI C, ACCARDO S: Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 155-60.
- 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.
- GALIE N, HUMBERT M, VACHIERY JL et al: 2015 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 2016; 37: 67-119.
- GUILLEN-DEL CASTILLO A, CALLEJAS-MORAGA EL, GARCIA G et al: High sensitivity and negative predictive value of the detect algorithm for an early diagnosis of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: Application in a single center. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 135.
- SIMBON-AZNAR CP, FONOLLOSA-PLA V, TOLONA-VILELLA C et al: Registry of the spanish network for systemic sclerosis: Survival, prognostic factors, and causes of death. *Medicine* (Baltimore) 2015; 94: e1728.
- HUDSON M, POPE J, MAHLER M et al: Clinical significance of antibodies to ro52/trim21 in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2012; 14: R50.
- HESELSTRAND R, SCHEJA A, SHEN GQ, WIK A, AKESSON A: The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology* (Oxford) 2003; 42: 534-40.
- JACOBSEN S, ULLMAN S, SHEN GQ, WIK A, HALBERG P: Influence of clinical features, serum antinuclear antibodies, and lung function on survival of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001; 28: 2454-9.
- CHANG WS, SCHOLLUM J, WHITE DH, SOLANKI KK: A cross-sectional study of autoantibody profiles in the waitkato systemic sclerosis cohort, new zealand. *Clin Rheumatol* 2015; 34: 1921-7.
- BOSSINI-CASTILLO L, LOPEZ-ISAC E, MAYES MD, MARTIN J: Genetics of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* 2015; 37: 443-51.
- MULLER CDE S, PAIVA EDOS S, AZEVEDO VF, RADOMINSKI SC, LIMA FILHO JH: Autoantibody profile and clinical correlation in a group of patients with systemic sclerosis in southern brazil. *Rev Bras Rheumatol* 2011; 51: 314-8, 23-4.
- HUNG EW, MAYES MD, SHARIF R et al: Gastric antral vascular ectasia and its clinical correlates in patients with early diffuse systemic sclerosis in the scot trial. *J Rheumatol* 2013; 40: 455-60.
- GHRENASSIA E, AVOUAC J, KHANNA D et al: Prevalence, correlates and outcomes of gastric antral vascular ectasia in systemic sclerosis: A eustar case-control study. *J Rheumatol* 2014; 41: 99-105.
- VANTHUYNE M, SMITH V, DE LANGHE E et al: The belgian systemic sclerosis cohort: Correlations between disease severity scores, cutaneous subsets, and autoantibody profile. *J Rheumatol* 2012; 39: 2127-33.
- MEYER OC, FERTIG N, LUCAS M, SOMOGYI N, MEDSGER TA Jr: Disease subsets, antinuclear antibody profile, and clinical features in 127 french and 247 us adult patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2007; 34: 104-9.
- HAMAGUCHI Y, HASEGAWA M, FUJIMOTO M et al: The clinical relevance of serum antinuclear antibodies in japanese patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2008; 158: 487-95.
- KUWANA M, OKANO Y, PANDEY JP, SILVER RM, FERTIG N, MEDSGER TA, Jr: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-rna polymerase iii antibody: Analytical accuracy and clinical associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2425-32.
- HOFFMANN-VOLD AM, MIDTVEDT O, TENNOE AH et al: Cardiopulmonary disease de-

- velopment in anti-rna polymerase iii-positive systemic sclerosis: Comparative analyses from an unselected, prospective patient cohort. *J Rheumatol* 2017; 44: 459-65.
41. PATTERSON KA, ROBERTS-THOMSON PJ, LESTER S *et al.*: Interpretation of an extended autoantibody profile in a well-characterized australian systemic sclerosis (scleroderma) cohort using principal components analysis. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 3234-44.
  42. NIHTYANOVA SI, SCHREIBER BE, ONG VH *et al.*: Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 1625-35.
  43. PENN H, HOWIE AJ, KINGDON EJ *et al.*: Scleroderma renal crisis: Patient characteristics and long-term outcomes. *QJM* 2007; 100: 485-94.
  44. TERRAS S, HARTENSTEIN H, HONTERMANN S, GAMBICHLER T, KREUTER A: Rna polymerase iii autoantibodies may indicate renal and more severe skin involvement in systemic sclerosis. *Int J Dermatol* 2016; 55: 882-5.
  45. GUILLEVIN L, BEREZNE A, SEROR R *et al.*: Scleroderma renal crisis: A retrospective multicentre study on 91 patients and 427 controls. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51: 460-7.
  46. NIKPOUR M, HISSARIA P, BYRON J *et al.*: Prevalence, correlates and clinical usefulness of antibodies to rna polymerase iii in systemic sclerosis: A cross-sectional analysis of data from an australian cohort. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R211.
  47. SHAH AA, ROSEN A: Cancer and systemic sclerosis: Novel insights into pathogenesis and clinical implications. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23: 530-5.
  48. JOSEPH CG, DARRAH E, SHAH AA *et al.*: Association of the autoimmune disease scleroderma with an immunologic response to cancer. *Science* 2014; 343: 152-7.
  49. LAZZARONI MG, CAVAZZANA I, COLOMBO E *et al.*: Malignancies in patients with anti-rna polymerase III antibodies and systemic sclerosis: Analysis of the EULAR scleroderma trials and research cohort and possible recommendations for screening. *J Rheumatol* 2017; 44: 639-47.
  50. BERNAL-BELLO D, DE TENA JG, GUILLENDEL CASTILLO A *et al.*: Novel risk factors related to cancer in scleroderma. *Autoimmun Rev* 2017; 16: 461-8.
  51. HESSELSTRAND R, SCHEJA A, WUTTGE DM: Scleroderma renal crisis in a swedish systemic sclerosis cohort: Survival, renal outcome, and rna polymerase iii antibodies as a risk factor. *Scand J Rheumatol* 2012; 41: 39-43.
  52. PARKER JC, BURLINGAME RW, WEBB TT, BUNN CC: Anti-rna polymerase III antibodies in patients with systemic sclerosis detected by indirect immunofluorescence and ELISA. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 976-9.
  53. VILLALTA D, IMBASTARO T, DI GIOVANNI S *et al.*: Diagnostic accuracy and predictive value of extended autoantibody profile in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2012; 12: 114-20.

