

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús estableties per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA AFECCIÓN PULMONAR ASOCIADA A
ESCLERODERMIA SISTÉMICA: BIOMARCADORES
PRONÓSTICOS Y DETECCIÓN PRECOZ**

Tesis presentada para optar al grado de Doctor

Doctorando:

Alfredo Guillén del Castillo

Directores:

Dra. Carmen Pilar Simeón Aznar

Dr. Vicent Fonollosa Plá

Dr. Miquel Vilardell Tarrés

Tutor:

Dr. Vicent Fonollosa Plá



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Programa de Doctorat en Medicina, Departament de Medicina

Barcelona, 2017

Carmen Pilar Simeón Aznar, Doctora en Medicina y Facultativa en Medicina Interna en el Hospital Universitario Vall d'Hebron, **Vicent Fonollosa Pla**, Catedrático de Medicina, Director del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y Consultor Senior del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Vall d'Hebron y **Miquel Vilardell Tarrés**, Profesor Emérito de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona.

CERTIFICAN:

Como co-directores, que el trabajo titulado: “Estudio de la afección pulmonar asociada a esclerodermia sistémica: biomarcadores pronósticos y detección precoz” realizado por el licenciado **Alfredo Guillén del Castillo**, reúne todos los requisitos científicos y formales para proceder a su lectura y defensa como tesis para acceder al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, firman el presente certificado en Barcelona a 12 de Junio de 2017.

Fdo. Carmen Pilar Simeón Aznar

Fdo. Vicent Fonollosa Pla

Fdo. Miquel Vilardell Tarrés

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Desearía agradecer a todas las personas que han puesto su grano de arena en este trabajo directa o indirectamente, y que sin ellas no hubiera sido posible.

Sin duda a la primera a la que debo agradecer muchas cosas, no sólo la realización de esta tesis, es a la Dra Siméon, mi mentora, líder en la investigación y conocimiento de la esclerodermia en este país. Gracias por enseñarme todo acerca de esta enfermedad, tu entrega para y por los enfermos, tu apoyo constante, tu perseverancia, tu disponibilidad plena y tus buenas maneras. Gracias por apostar por mí, y por darme oportunidades que jamás hubiera pensado tener. Es un lujo y un privilegio poder trabajar contigo.

Agradecer también al Dr Fonollosa su confianza en mí desde el principio, por apoyarme en los nuevos proyectos y abrirme camino en el ámbito universitario.

Al Dr Vilardell, exjefe del servicio de Medicina Interna, sin su ayuda esta tesis no hubiera visto la luz.

Al resto de adjuntos del servicio de Medicina Interna de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, con los cuales he tenido el privilegio de trabajar durante estos años y aprender esta especialidad tan bonita, en especial al Dr Selva, Dra Solans, Dr Martínez-Valle y Dr Buján.

Gracias a la Dra. Pallisa por su indispensable cooperación y disponibilidad plena para el análisis de las pruebas de imagen.

A los compañeros de neumología, a Sara Sánchez-Vidaurre por el duro trabajo de laboratorio analizando el aire exhalado. Al Dr Muñoz y a Ma Jesus Cruz por prestar su colaboración y confianza en mí a la hora de llevar a cabo el estudio.

A los compañeros de cardiología, especialmente al Dr Rodríguez-Palomares y a la Dra García por la ardua tarea en la revisión de los datos ecocardiográficos.

Una mención especial a Eduardo Callejas, compañero de tareas de investigación y guardias, gracias por tu enorme ayuda con las bases de datos.

Agradecer a dos grupos de guardias, que suponen dos etapas en el hospital. En primer lugar a la *horchata*, por enseñarme gran parte de la medicina que sé y por ser una gran familia, en especial a los que fueron mis *R* mayores Cris B, Madda, Maca, Isi y a mis *R* pequeñas Begoña, Ana G y Andrea por ser unas grandes amigas. En segundo lugar gracias a los *nefastos* por acogerme en vuestra gran familia, en especial a Jaume, Estefanía, Eloi, Olga, Yuri, Marc y Adaia.

Gracias a los que una vez fueron mis *MAUs* y después se convirtieron en compañeros de trincheras, especialmente a Santi, Ernesto, Eli, Montse, Sheila y Mar.

Agradecer a toda la familia Berastegui, por acogerme en momentos tan especiales como a uno más y hacerme sentir como en casa.

A todos los *chungitos y consortes*: Bárbara y Óscar, Raquel, Nora e Íñigo y Patri, mil gracias por ayudarme a ser lo que soy. Bárbara, gracias por tantos consejos, compartir

tantas horas de estudio, de diversión y por ser una gran amiga y persona, gracias por guiarme en el camino hacia Barcelona.

Gracias a Mercé y Patri por ser grandes compañeras y amigas. Mercé darte las gracias una vez más por tu gran ayuda con la estadística.

A Serafín, por tu apoyo incondicional, sin ti este trabajo no pudiera haber salido adelante.

Al resto de *hermanos Christopher* de aventuras: Tere y Rafa, Ainhoa, Ma José y Virginia, gracias por hacer posible la desconexión, por vuestras risas, por vuestra pasión para conocer nuevas culturas.

En último lugar y no por ello menos importante, gracias a toda mi familia, mis padres Ramón y Ma Victoria, mis hermanos y cuñados Ana y David, Bea y David, Cris y Josean, Victor y Natalia, mis tíos Jesus Mari e Ignacio, mis sobrinos Leyre, Uxue, Naroa, Julen e Ibai, y en especial en memoria de los que ya no están, mi tío Tomás y tía Blanca Esther. Gracias en especial a mi madre y a mi hermana Cris por guiarme en el camino de la Medicina. Gracias a todos por demostrarme con el ejemplo que con el esfuerzo, amor al trabajo, constancia y humildad se puede llegar a donde uno se proponga.

ABREVIATURAS

ACR: American College of Rheumatology

ACA: anticuerpos anti-centrómero

AE: aire exhalado

ANA: anticuerpos anti-nucleares

Anti-Scl-70: anticuerpos anti-topoisomerasa I

ARE: antagonista del receptor de endotelina

ATS: Sociedad Torácica Americana

ASIG: Australian Scleroderma Interest Group

CAE: condensado de aire exhalado

CaNO: concentración alveolar de óxido nítrico exhalada

CCD: cateterismo cardíaco derecho

CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo

DLCO: capacidad de difusión de monóxido de carbono

FeNO: fracción exhalada de óxido nítrico

EPI: enfermedad pulmonar intersticial

ERS: Sociedad Europea de Respiratorio

ES: esclerodermia o esclerosis sistémica

EULAR: European League Against Rheumatism

EUSTAR: EULAR Scleroderma Trials and Research

FR: fenómeno de Raynaud

FVC: capacidad vital forzada

HAP: hipertensión arterial pulmonar

HP: Hipertensión pulmonar

HR: hazard ratio

IBP: inhibidor de la bomba de protones

ICAM: moléculas de adhesión intercelular

IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IFP: articulaciones interfalangicas proximales

IL: interleuquina

KCO: cociente de la DLCO entre el volumen alveolar

MCF: articulaciones metacarpofalágicas

NINE: neumopatía intersticial no específica

mRSS: escala modificada de Rodnan

OMS: Organización Mundial de la Salud

NO: óxido nítrico

OR: odds ratio

PAPm: presión arterial pulmonar media

PAPs: presión arterial pulmonar sistólica

PCP: presión capilar pulmonar

PDE-5: fosfodiesterasa 5

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFR: pruebas de función respiratoria

PHAROS: Pulmonary Hypertension Assessment and Recognition of Outcomes in

Scleroderma

POLR3A: gen de la RNA polimerasa III

RESCLE: registro español de esclerodermia

RM: resonancia magnética

SLP: supervivencia libre de progresión de la enfermedad

TACAR: TC pulmonar de alta resolución

TC: tomografía computarizada

TGF- β : factor de crecimiento transformante-beta

TLR: receptores toll-like

Th2: linfocitos T helper 2

UD: úlceras digitales

VCAM1: moléculas de adhesión vascular 1

VRT: velocidad de regurgitación tricuspídea

ÍNDICE

Agradecimientos	7
Abreviaturas	11
Índice	15
1. Introducción	19
1.1. Historia	21
1.2. Definición	21
1.3. Epidemiología	21
1.4. Fisiopatología	23
1.4.1. Disfunción microvascular	23
1.4.2. Proceso inflamatorio autoinmune	24
1.4.3. Fibrosis tisular	25
1.5. Criterios diagnósticos y clasificación	26
1.6. Diagnóstico diferencial	32
1.7. Manifestaciones clínicas	36
1.7.1. Inicio de la enfermedad	36
1.7.2. Afección vascular periférica	37
1.7.3. Afección cutánea	38
1.7.4. Afección musculoesquelética	40
1.7.5. Afección digestiva	42
1.7.6. Afección cardíaca	44
1.7.7. Crisis renal esclerodérmica	46
1.7.8. Afección respiratoria	46
2. Afección pulmonar asociada a la esclerodermia	47

2.1. Enfermedad pulmonar intersticial (EPI)	49
2.2. Hipertensión arterial pulmonar (HAP).....	54
3. El valor de los anticuerpos específicos de esclerodermia.....	63
3.1. Anticuerpo anti-centrómero (ACA)	67
3.2. Anticuerpo anti-Scl-70 o anti-topoisomerasa I	67
3.3. Anticuerpo anti-RNA polimerasa III	68
3.4. Anticuerpo anti-Th/To	69
3.5. Anticuerpo anti-U3RNP o anti-fibrilarina	69
3.6. Anticuerpo anti-U1RNP.....	70
3.7. Anticuerpo anti-PM/Scl	70
3.8. Anticuerpo anti-Ku.....	71
3.9. Anticuerpo anti-U11/U12.....	72
4. Pronóstico	73
5. Tratamiento.....	79
6. Justificación del estudio.....	87
7. Objetivos.....	91
8. Publicaciones	95
▪ Artículo 1: Good outcome of interstitial lung disease in patients with scleroderma associated to anti-PM/Scl antibody.....	97
▪ Artículo 2: Prognostic Role of Exhaled Breath Condensate pH and Fraction Exhaled Nitric Oxide in Systemic Sclerosis Related Interstitial Lung Disease.....	105
▪ Artículo 3: 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	113
9. Discusión general.....	141
▪ Valor pronóstico de los anticuerpos anti-PM/Scl en los pacientes con EPI-ES	144

▪ Utilidad pronóstica del condensado de aire exhalado y el aire exhalado en la EPI-ES	148
▪ Utilidad del algoritmo DETECT en el diagnóstico precoz de la HAP-ES	152
10. Conclusiones	157
11. Bibliografía	161

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia

El término esclerodermia, proviene del griego “*sklerós*” y “*dérma*”, que significa piel endurecida. Se considera que Carlo Curzio fue en Nápoles en 1753, el primero en describir un caso sugestivo de la enfermedad, sobre una paciente de 17 años con endurecimiento de la piel, especialmente del cuerpo y la cara [1]. Curzio trató a la paciente con flebotomías, leche templada y pequeñas dosis de sales de mercurio con éxito, lo cual hace pensar que es probable que la paciente no tuviera esclerodermia. No fue hasta mitades del siglo XIX cuando el término esclerodermia se estableció como una entidad clínica y se comenzara a nombrarla así tras una descripción de 4 casos realizada por Gintrac en 1847.

1.2. Definición

La esclerodermia o esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad autoinmune que afecta a múltiples órganos y sistemas, caracterizada principalmente por presentar una disfunción microvascular, mostrar alteraciones inmunológicas autoinmunes y por una reparación tisular aberrante con una producción excesiva de matriz extracelular [2-5].

1.3. Epidemiología

La incidencia y prevalencia varía sustancialmente alrededor del mundo, y dependiendo de los criterios de diagnóstico utilizados. Se considera una enfermedad rara, ya que la incidencia de la ES está estimada entre 3.7-22.8 nuevos casos por millón de habitantes-año, siendo la prevalencia en torno a 31-658.6 pacientes por millón de habitantes [6]. Debido a la publicación de los nuevos criterios clasificatorios de la ES en 2013 de forma conjunta por el American College of Rheumatology (ACR) y el European League Against Rheumatism (EULAR) [7], la prevalencia parece ser mucho mayor de la previamente estimada, en torno a 88 pacientes por millón de habitantes en el sexo

masculino y 514 por millón de habitantes en el sexo femenino, según los resultados de un estudio realizado recientemente en Suecia [8].

La edad de presentación se sitúa en torno a la cuarta década de la vida (media 44.9 años) y muestra un predominio por el sexo femenino (7:1) [9], con una polaridad norte-sur, presentando una mayor proporción a favor de la mujer en el sur de Europa respecto a los países del norte donde la proporción es de (4.8:1) [10-12]. El sexo masculino se ha asociado con un mayor riesgo de ES subtipo difusa (odds ratio (OR): 1.68), mayor frecuencia de úlceras digitales (UD) (OR: 1.28), de hipertensión pulmonar (HP) (OR: 3.01) y mortalidad por todas las causas (hazard ratio (HR): 1.48) [13].

La etnia juega un papel importante en el modo de presentación y curso evolutivo de la ES. De este modo, los pacientes de origen afro-americano desarrollan la enfermedad a edades más tempranas, el subtipo cutáneo de ES difusa es el predominante, tienen más frecuencia de anticuerpos anti-topoisomerasa I (anti-Scl-70), enfermedad pulmonar restrictiva y una mortalidad aumentada [14].

La baja prevalencia de la ES hace pensar que los factores causales necesarios ocurren poco frecuentemente, y al ser una enfermedad compleja, entre estos factores probablemente se incluyan factores ambientales y factores de susceptibilidad genética. A este respecto, estudios realizados en cohortes de gemelos muestran una concordancia de presentar ES únicamente del 4.7%, no mostrando diferencias entre los gemelos mono y dicigóticos [15]. Además, existe una concordancia del 90% para la detección de anticuerpos anti-nucleares (ANA) a títulos $\geq 1:40$ en gemelos monocigóticos, que resulta significativamente mayor al 40% en los gemelos dicigóticos. Por tanto, parece evidenciarse que los factores genéticos no son suficientes para el desarrollo de la enfermedad aunque sí

pueden tener importancia en relación a presentar un mayor riesgo de reactividad frente a ANAs o una mayor tendencia a la autoinmunidad.

El desarrollo de la enfermedad se ha relacionado con la exposición a ciertos productos químicos ambientales como disolventes orgánicos, la sílice, el cloruro de vinilo monomérico, resinas epoxi, humos de soldadura, L-triptófano e incluso con tratamientos quimioterápicos como la bleomicina [16-18]. Si bien, esta exposición está asociada a una mayor prevalencia en el sexo masculino y unas características clínicas diferentes.

1.4. Fisiopatología

Actualmente, se piensa que la ES está causada por una serie de agentes ambientales que interceden sobre un individuo genéticamente predisposto, lo cual desencadena una serie de múltiples procesos auto-amplificadores, libres del control por los mecanismos de regulación habitual, que se perpetúan de forma crónica, provocando la desregulación y disfunción de los mecanismos de reparación del tejido conectivo en respuesta al daño tisular. A este respecto, todos los responsables de la reparación tisular podrían estar implicados en la enfermedad. La patogénesis de la ES se caracteriza principalmente por la siguiente tríada: una disfunción microvascular, un proceso inflamatorio autoinmune y la fibrosis tisular [5, 19].

1.4.1. Disfunción microvascular

Se postula que la cascada patogénica se inicia por el daño microvascular, la activación endotelial y la activación plaquetaria [20], posiblemente provocada por diferentes mecanismos como infecciones víricas (parvovirus, citomegalovirus) [18], fenómenos de isquemia-reperfusión, toxinas o auto-anticuerpos. El daño vascular progresivo causa una

disminución en el número de capilares, engrosamiento de la pared vascular como consecuencia de una proliferación de la íntima y de la capa muscular lisa, que contribuye al estrechamiento de la luz vascular, la hipoxia tisular y la liberación de especies reactivas de oxígeno.

Así mismo, el endotelio vascular activado incrementa la expresión de moléculas de adhesión como las moléculas de adhesión vascular 1 (VCAM1), las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) o la E-selectina, lo cual favorece el reclutamiento de células inflamatorias. Además se liberan una cantidad de mediadores como la endotelina 1, quemoquinas, factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) o el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), que favorecen la proliferación del músculo liso vascular y la activación del miofibroblasto.

1.4.2. Proceso inflamatorio autoinmune

Existe un proceso autoinmune, con una alteración tanto del sistema inmune innato como adaptativo. En respuesta a la liberación de quemoquinas y expresión de receptores de adhesión celular, diferentes células inflamatorias son reclutadas: los linfocitos T helper 2 (Th2) que secretan TGF- β e interleuquina 13 (IL-13), las células B productoras de auto-anticuerpos e IL-6, macrófagos que liberan TGF- β , células dendríticas que liberan interferón- α (IFN- α) y factor plaquetar 4 (FP-4). Así mismo, dichas células presentan una expresión de los genes regulados por la vía del IFN tipo I [21], lo que conlleva a una activación de los receptores toll-like (TLR) que median la señalización inmune [22]. Una gran parte de las células inmunes que infiltran el tejido derivan de médula ósea, tales como los linfocitos T CD-4, los macrófagos y las células B, las células dendríticas

plasmocitoides y los mastocitos. Además de la predominancia de la respuesta Th2 y la liberación de IL-4 e IL-13, existe un aumento de la respuesta Th17 con liberación de IL-17 que contribuye a la respuesta de fibrosis. Sin embargo, la respuesta inmune Th1 que libera IFN- γ con actividad antifibrótica está disminuida.

Recientemente, se ha demostrado el papel patogénico de los macrófagos activados de manera alternativa, con fenotipo M2, aumentados en suero y tejido tisular pulmonar, que parecen estar implicados en el daño vascular y la fibrosis [23]. La IL-6 producida por una gran variedad de subtipos celulares, entre ellos células B y T, fibroblastos, fibrocitos y células endoteliales, adquiere gran importancia en la fisiopatología de la enfermedad, dado que puede inducir la respuesta Th2, la inflamación y la fibrosis.

Aunque los ANAs están presentes en la práctica totalidad de los pacientes, están dirigidos frente a antígenos intranucleares y son primordiales para el diagnóstico de la ES, pero su papel patogénico todavía es desconocido.

1.4.3. Fibrosis tisular

Los fibroblastos residentes tisulares, activados por la gran cantidad de citoquinas, generan especies reactivas de oxígeno y sufren una diferenciación a miofibroblastos, que son los responsables de la producción excesiva de matriz extracelular, compuesta por colágeno, elastina, glucosaminoglucanos y fibronectina [24]. La activación del TLR-4 en las células inmunes y los miofibroblastos por la propia matriz extracelular incrementa este proceso. El miofibroblasto se caracteriza por poseer actividad contráctil debido a la expresión de la actina muscular lisa α , y ser resistente a la apoptosis. Además, secreta otros mediadores profibróticos, como el TGF- β , CTGF, favoreciendo una retroalimentación

positiva. Existen otras células que también contribuyen en la diferenciación a miofibroblastos, como los fibroцитos, células progenitoras mesenquimales circulantes derivadas del monocito, e incluso se ha descrito la transdiferenciación desde los pericitos, telocitos, células endoteliales y células epiteliales a través del proceso de transición epitelio-mesenquimal [25]. El excesivo depósito de colágeno, provoca la rigidez, disminuye la elasticidad de los órganos y aumenta el estrés mecánico. El estrés mecánico tisular es sentido por las integrinas presentes en la superficie celular del miofibroblasto, perpetuando su activación y el proceso fibrótico [26].

1.5. Criterios diagnósticos y clasificación

En ausencia de un test diagnóstico único que demuestre la presencia o ausencia de la ES, se han desarrollado diversos criterios clasificatorios. El propósito de los criterios de clasificación es incluir a pacientes con entidad clínica similar para la investigación clínica. Los criterios de clasificación, no son sinónimos de criterios diagnósticos los cuales son los más ampliamente utilizados por el médico en la práctica clínica ante un caso clínico concreto.

Tabla 1. Criterios preliminares de clasificación del ACR de 1980

Criterio Mayor

Esclerosis cutánea proximal a articulaciones metacarpofalángicas

Criterios Menores

Esclerodactilia

Cicatrices puntiformes o pérdida de sustancia en el pulpejo de los dedos

Fibrosis pulmonar bibasal

Clasificación ES: 1 criterio mayor o ≥ 2 criterios menores

En 1980 se publicaron los criterios preliminares de clasificación de la ES por el ACR, que tenían por objetivo establecer los criterios de la enfermedad definida por el mínimo número de variables, identificando un criterio mayor y dos criterios menores (tabla 1) [27].

Sin embargo, en años siguientes se observó que estos criterios presentaban una baja sensibilidad para los casos de ES subtipo limitada o ES *sine* esclerodermia y un escasa inclusión de enfermos en fases iniciales. Como consecuencia, gran parte de los enfermos eran excluidos de estudios sobre la enfermedad y de los ensayos clínicos.

Tabla 2. Subtipos de ES según LeRoy 1988

	Esclerodermia limitada	Esclerodermia difusa
Fenómeno de Raynaud	Años (ocasionalmente décadas)	< 1 año
Induración cutánea	Distal a codos y rodillas o cara Ausente	Distal y proximal a codos y rodillas
Manifestaciones clínicas	Afección visceral tardía Hipertensión arterial pulmonar Telangiectasias Calcinosis	Afección visceral temprana Enfermedad pulmonar intersticial Crisis renal esclerodérmica Afección gastrointestinal Afección cardíaca Roces tendinosos
Perfil inmunológico	70-80% anti-centrómero (ACA)	30% anti-topoisomerasa I Ausencia de ACA
Capilaroscopia	Dilataciones capilares	Pérdida capilar
Pronóstico	Favorable	Desfavorable

Posteriormente, en 1988 LeRoy *et al.* propuso una clasificación de ES en dos subtipos principales, definidos por la extensión de la induración cutánea (tabla 2) [28]. De este modo los enfermos con ES limitada eran aquellos que presentaban una extensión de la induración distal a codos y rodillas, incluyendo la cara, o bien la induración estaba ausente. Un segundo grupo con ES difusa estaba caracterizado por esclerosis distal y proximal a codos y rodillas, el cual por definición ya cumplía los criterios de clasificación de 1980. Además, LeRoy, basado en su experiencia clínica describió las características diferenciales de estos dos grupos de pacientes, en relación a la duración del fenómeno de Raynaud (FR), manifestaciones clínicas más relevantes, perfil inmunológico de auto-anticuerpos, alteraciones capilaroscópicas y pronóstico de la enfermedad.

Una revisión sistemática realizada recientemente de los criterios de clasificación de la ES publicados hasta el 2005 [29], comparaba la sensibilidad, validez y fiabilidad de hasta un total de 14 propuestas diferentes, concluyó que la clasificación propuesta por LeRoy, no sólo era la más ampliamente utilizada y referenciada, sino que era la clasificación con una mayor viabilidad, una validez aceptable y un buen valor predictivo.

Posteriormente en 1996 Denton *et al.*, introducen el concepto de pre-esclerodermia [30], haciendo referencia a un grupo de personas que no cumplen los criterios clasificatorios de la enfermedad pero que tienen mayor riesgo de desarrollar una ES establecida a lo largo de un periodo de tiempo. La pre-esclerodermia estaría definida por la presencia de FR y/o 1) alteraciones capilaroscópicas y/o 2) anticuerpos anti-nucleares específicos de la ES (anti-Scl-70, ACA o patrón nucleolar) y/o 3) cambios isquémicos digitales.

Más adelante, LeRoy y Medsger en el 2001 vuelven a modificar la clasificación con la intención de incluir a personas con características incipientes de la ES, pero no del todo definitorias, bajo el término ES limitada (tabla 3) [31]. Recientemente se ha cambiado esta terminología por pre-ES o ES temprana, para evitar la confusión con el grupo de pacientes con ES cutánea limitada [9, 32, 33].

Tabla 3. Subtipos de ES según LeRoy y Medsger 2001**1. ES limitada o pre-ES****A. Fenómeno Raynaud** documentado de forma objetiva mediante:

- 1) Observación directa de ≥ 2 de: a) palidez, b) cianosis, c) sufusión
- 2) Medición directa de la respuesta al frío por
 - a) evidencia del retraso en la recuperación tras el estímulo frío o
 - b) Test de Nielsen o equivalentes (ultrasonidos láser Doppler, termografía, cristales termosensibles, etc.)

B. Capilaroscopia alterada (presencia de dilataciones y/o áreas avasculares)**C. Anticuerpos específicos de ES** (ACA, anti-Scl-70, anti-fibrilarina, anti-PM/Scl, anti-Th/To o anti-RNA polimerasa III en título \geq a 1:100)

Si A está presente, sólo es necesario B o C.

Si el FR es subjetivo, B y C son necesarios para definir ES limitada.

ES limitada puede formar parte de un síndrome de solapamiento con otras conectivopatías.

2. ES cutánea limitada

Criterios de ES limitada y cambios cutáneos distales a codos y rodillas

3. ES cutánea difusa

Criterios de ES limitada y cambios cutáneos proximales a codos y rodillas

4. Fascitis difusa con eosinofilia

Cambios cutáneos proximales sin criterios de ES limitada o ES cutánea limitada

Con el propósito de validar los criterios de LeRoy y Medsger y establecer los marcadores predictivos más importantes para desarrollar una ES definida, Kenig *et al.* estudió de forma prospectiva una serie de 586 pacientes con FR que no tenían una enfermedad de tejido conectivo determinada [34]. A todos ellos les realizó la determinación de auto-anticuerpos específicos y capilaroscopia. La mediana de seguimiento fue de 4 años. Evidenció que los pacientes con alteraciones capilaroscópicas (dilataciones y/o pérdida capilar) presentaban 5 veces más riesgo de desarrollar ES definida (HR: 5.3), los pacientes con anticuerpos específicos presentaban 8.5 veces más riesgo (HR: 8.5) y si ambos estaban presentes existía 60 veces más riesgo de progresar a ES definida (HR: 60.08).

Posteriormente, Valentini *et al.* estudió de forma activa los pacientes clasificados como ES limitada mediante la realización de ecocardiografía, pruebas de función respiratoria (PFR) y manometría esofágica, encontrando que el 42% de los pacientes presentaban alteraciones orgánicas incipientes [33]. De este modo, se concluye que los pacientes previamente clasificados como pre-ES, deben ser estudiados de forma exhaustiva aunque no presenten manifestaciones clínicas, porque pueden tener alteraciones incipientes o bien afecciones orgánicas definitorias de ES asintomáticas [35].

Para una mejor clasificación de la ES, los pacientes hasta ahora definidos como pre-ES deben diferenciarse en dos subgrupos dependiendo de los resultados de las pruebas complementarias en a) Pre-esclerodermia o ES muy temprana, en aquellos pacientes en los que se descarta cualquier tipo de alteración orgánica, y b) ES temprana o inicial, cuando se objetivan afecciones viscerales incipientes pero que no alcanzan el rango de una afección orgánica definida de ES, o bien que presentan manifestaciones vasculares típicas como telangiectasias o úlceras digitales [32, 33, 36].

Recientemente se han publicado los nuevos criterios clasificatorios de la ES por el ACR/EULAR (tabla 4) [7], con la finalidad de aumentar la sensibilidad y especificidad de los criterios anteriores del ACR 1980, clasificar enfermos desde estadíos más precoces, e incluir manifestaciones tanto vasculares, fibróticas e inmunológicas.

Tabla 4. Criterios de clasificación de ACR/EULAR 2013

Ítem	Sub-ítem(s)	Puntos
Induración cutánea de los dedos de ambas manos que se extiende proximalmente a articulaciones MCF		9
Induración de la piel de los dedos*	Dedos edematosos tumefactos o “en salchicha”	2
	Esclerodactilia (distal a MCF pero proximal a IFP)	4
Lesiones en pulpejos*	Úlceras digitales	2
	Cicatrices puntiformes en pulpejos	3
Telangiectasias		2
Alteraciones en la capilaroscopia periungueal (dilataciones y/o pérdida)		2
Afección pulmonar*	Hipertensión arterial pulmonar y/o Enfermedad pulmonar intersticial	2
Fenómeno de Raynaud		3
Auto-anticuerpos específicos de ES*	ACA anti-Scl-70 anti RNA pol III	3
Clasificación ES definida: puntuación ≥ 9		
*puntuación máxima del subítem con puntuación más alta o de un único subítem		
MCF: articulaciones metacarpofalálgicas; IFP: articulaciones interfalangicas proximales		

Están basados en el modo de diagnóstico en la práctica habitual, permitiendo una aplicación sencilla y un mayor cumplimiento de los mismos lo que supone un aumento en el número de pacientes que pueden participar en estudios y ensayos clínicos.

Los criterios no son aplicables a pacientes con induración cutánea que no afecte a los dedos o a pacientes con otro síndrome esclerodermiforme que puedan explicar mejor sus manifestaciones clínicas (por ejemplo, con fibrosis nefrogénica, morfea generalizada, fascitis eosinofílica, escleredema, escleromixedema, eritromelalgia, porfiria, liquen escleroso, enfermedad injerto contra huésped y queiroartropatía diabética). La puntuación total es determinada al sumar la puntuación máxima de cada categoría, y los pacientes con una puntuación ≥ 9 se clasifican como una ES definida. Los nuevos criterios presentan una sensibilidad del 0.91 y una especificidad del 0.92 en cohortes de validación, francamente superiores al 0.75 y 0.72 utilizando los criterios de ACR de 1980 respectivamente.

Recientemente, un trabajo publicado por el registro español de esclerodermia (RESCLE) ha confirmado la utilidad clínica de los nuevos criterios clasificatorios [37]. De este modo el 87.5% de los pacientes con diagnóstico de ES en la cohorte española son clasificados como ES siguiendo los criterios de ACR/EULAR 2013, frente al 63.5% de los pacientes en el caso de utilizar los criterios previos del ACR de 1980. Este trabajo pone en evidencia que los nuevos criterios clasificatorios son más sensibles especialmente a la hora de clasificar los pacientes con ES limitada, *sine* esclerodermia y ES iniciales.

1.6. Diagnóstico diferencial

Ante un paciente con FR o lesiones isquémicas digitales, es necesario considerar el rango de etiologías potenciales que incluyen las diferentes conectivopatías, alteraciones

vasculares estructurales, fenómenos embólicos o factores precipitantes (tabla 5).

Tabla 5. Diagnóstico diferencial del Fenómeno de Raynaud

Causa	
Enfermedad de pequeñas arterias	Lupus eritematoso sistémico Dermatomiositis Síndrome antifosfolípido Vasculitis de pequeño vaso Crioglobulinemia Criofibrinogenemia Enfermedad por crioaglutininas Policitemia Tromboangeítis obliterans o enfermedad de Buerger
Vasculopatía estructural	Síndrome de la salida torácica Síndrome del túnel carpiano Aterosclerosis
Respuesta vasomotora anormal	Fenómeno de Raynaud primario Acrociánosis Feocromocitoma
Fármacos / tóxicos	Símpaticomiméticos Cloruro de polivinilo Nicotina Cocaína

Aproximadamente el 4-15% de la población general presenta FR [38]. En la mayoría de los casos, no está asociado a cambios estructurales vasculares ni daño tisular isquémico, por ello se denomina FR primario. El FR primario comienza de forma característica en la adolescencia, es más frecuente en mujeres (4:1), es simétrico en dedos y/o pies y el paciente no presenta ninguna otra alteración orgánica, UD, lesiones con pérdida de sustancia en los pulpejos de los dedos ni gangrena. Además, el individuo o la persona no refiere ningún síntoma en la anamnesis dirigida de enfermedades de tejido conectivo, la capilaroscopia periungueal es normal, sin alteraciones del lecho microvascular, ni existe positividad para ningún anticuerpo específico de ES en sangre periférica.

En cuanto a la induración cutánea, a pesar de que en la ES es fácilmente reconocible en los casos en los que está presente de forma muy evidente, el diagnóstico diferencial en casos tempranos es de vital importancia para un abordaje precoz de las afecciones orgánicas asociadas y un tratamiento específico. La historia clínica y la exploración física son fundamentales para un diagnóstico preciso, así como la distribución y las características de la induración cutánea. La ausencia de FR, una capilaroscopia normal y la ausencia de anticuerpos específicos van en contra del diagnóstico de ES (tabla 6).

Tabla 6. Diagnóstico diferencial de la ES

Enfermedad	Distribución	Consistencia cutánea	Hallazgos sistémicos	Laboratorio	FR/ capilaroscopia
Esclerodermia	Manos y cara frecuente; ES difusa afecta a región proximal de extremidades; espalda respetada	Induración gruesa, suave, induración brillante	Reflujo gastroesofágico; disfagia; enfermedad pulmonar intersticial; hipertensión pulmonar	ANAs positivos; Anticuerpos específicos ES	Universal / alteraciones frecuentes
Síndrome eosinofilia-mialgia[39]	Extremidades; respeta manos y pies	Induración leñosa, más profunda que la dermis superficial	Mialgias graves, calambres musculares, mioclonías, polineuropatía	Eosinofilia periférica	No / normal
Fascitis eosinofílica[40]	Extremidades y tronco; respeta la cara	Induración leñosa, más profunda que la dermis superficial	Puede tener solapamiento con morfea, alteraciones hematológicas, ejercicio intenso previo o traumatismo	Eosinofilia periférica	Raro / normal
Dermopatía fibrosante nefrogénica[41]	Extremidades y tronco; respeta la cara	Nodular, placas induradas con hiperpigmentación marronácea	Contracturas en flexión, insuficiencia renal; exposición a gadolinio	Insuficiencia renal	Raro / normal
Morfea panesclerótica[42]	Extremidades, cara, pies; respeta la cara	Induración gruesa, similar a la de la ES difusa	Contracturas; no afección sistémica de ES	Ninguna	Raro / normal
Escleredema[43]	Cuello, espalda, brazos proximales, cara	Induración pastosa	Discomfort en áreas afectadas; diabetes mal controlada; infección estreptocócica reciente; gammaglobulina monoclonal	Hiperglucemia; gammaglobulina monoclonal	No / normal
Escleromixedema[44]	Distribución similar a ES, con hallazgos prominentes en glabela, pabellones auriculares y cuello	Induración en empedrado con pápulas céreas de 2-3 mm	Disfagia; dolor musculoesquelético; afección neurológica (crisis comicial, coma)	Gammaglobulina monoclonal	Raro / normal
Síndrome del aceite tóxico[45]	Extremidades respetando manos y pies	Progresión desde lesiones urticiformes a induración pastosa y a fibrosis similar a ES	Infiltrados pulmonares, derrame pleural, mialgias, prurito grave, fiebre, neuropatía periférica	Eosinofilia periférica, elevación de triglicéridos, hipercolesterolemia, trombocitopenia	No / normal

1.7. Manifestaciones clínicas

La ES es una enfermedad autoinmune multisistémica, la cual puede afectar a diferentes órganos y sistemas de forma muy diversa y a su vez de forma heterogénea entre un paciente y otro. Es por eso que la Dra. Steen denominó las “múltiples caras de la esclerodermia” [46], para hacer referencia a que las manifestaciones clínicas que un paciente presenta difieren de otro en gran parte dependiendo del subtipo cutáneo y del anticuerpo específico que se aísla en sangre periférica. De este modo, se trataría la ES como un grupo de diferentes enfermedades, que se acabarían de especificar mediante los auto-anticuerpos y el grado de extensión cutánea.

1.7.1. Inicio de la enfermedad

La fecha de inicio de la enfermedad está definida por la fecha del primer síntoma atribuible a la ES, incluyendo el FR, como previamente se ha reportado en otros trabajos científicos [47-53]. Algunos autores consideran como fecha de inicio de la enfermedad el primer síntoma diferente al FR, pero no tener en cuenta el FR como fecha de inicio de la enfermedad tiene diferentes repercusiones. Por una parte en los subtipos con ES limitada y *sine* se produce un sesgo en el cálculo de la supervivencia acumulada ya que si se realiza la estimación desde el primer síntoma diferente al FR la supervivencia es notablemente menor y depende de la rapidez con la que se remite al enfermo a los centros de experiencia para que realicen el diagnóstico, y en el subtipo de ES difusa si en los ensayos se considera como fecha de inicio el primer síntoma diferente al FR es posible que un % importante de enfermos se incluyan cuando ha pasado la fase de máxima induración cutánea.

1.7.2. Afección vascular periférica

La afección vascular periférica en forma de FR supone la manifestación clínica más frecuente y característica de la enfermedad, se presenta en la práctica totalidad de los pacientes, un 93.1% en la cohorte del grupo RESCLE [9]. El FR es el proceso que describió Maurice Raynaud en 1862 [54], documentando la serie de efectos de cambio de coloración de la piel fruto del vasoespasio como respuesta a la exposición al frío, caracterizados inicialmente por palidez, posteriormente cianosis y que acaban con hiperemia o sufusión reactiva. Se presenta principalmente en los dedos de las manos, pero no de forma exclusiva, pudiendo aparecer en otras regiones acras, como en los dedos de los pies, nariz, orejas o incluso la lengua. El estrés emocional o ansiedad también pueden ser factores desencadenantes [55].

Las UD son consecuencia de un FR intenso, se definen como la pérdida de epitelización de la epidermis y tejidos subyacentes en diferentes grados hasta la exposición de la dermis, tejido celular subcutáneo y algunas veces hasta el hueso, pudiendo originar una gangrena digital [56]. Pueden ocurrir tanto en la punta de los dedos de las manos como de los pies o sobre las superficies de extensión o en las articulaciones en asociación a calcinosis. Se estima que en un año aproximadamente el 30% de los pacientes desarrollan una UD y los pacientes con UD persistentes tienen un 30% de riesgo de pérdida tisular permanente [57]. Además hasta el 41.6% de los pacientes padecerán alguna UD en el curso evolutivo de la enfermedad [58]. Las UD causan dolor local, deterioro funcional secundario para realizar las actividades de la vida diaria y por ello tienen un alto impacto negativo en la calidad de vida. Además se pueden complicar por infección, gangrena digital, osteomielitis del hueso subyacente e incluso autoamputación de falanges distales. Las cicatrices en mordedura de rata son

áreas deprimidas en la punta de los dedos secundarias a isquemia, son hiperqueratósicas pero no muestran desepitelización de la epidermis.

La acroosteólisis es la resorción ósea de las falanges distales como consecuencia de la isquemia que afecta al 8.9% de los pacientes [58].

Las telangiectasias son dilataciones capilares de los vasos superficiales, típicamente en mancha, que desaparecen a la vitropresión, se localizan más frecuentemente en manos, cara, boca, labios, y región del escote.

1.7.3. Afección cutánea

Es la alteración más característica de la ES con la fibrosis y esclerosis de la piel. Sin embargo, no siempre está presente ya que tanto el subtipo cutáneo ES *sine* esclerodermia que supone el 7.5% de todos los pacientes con ES, o los subtipos con riesgo de desarrollar ES definida como la pre-ES y la ES inicial no presentan induración de la piel, suponiendo en global el 11.5% de todos los pacientes con ES [9]. La induración se evidencia por la dificultad al pellizcar la piel, por estar engrosada y sin elasticidad. La esclerosis cutánea también provoca la pérdida de los pliegues en la epidermis. Así mismo, el grado de endurecimiento y la extensión cutánea se cuantifica de forma semicuantitativa por la escala modificada de Rodnan (mRSS) [59], según una graduación del 0 al 3 (0: no engrosamiento; 1: engrosamiento leve, no se forman arrugas finas al pellizcar; 2: engrosamiento moderado; 3 engrosamiento grave, imposible de pellizcar) realizada en 17 áreas corporales (dorso de dedos, dorso de manos, región extensora de antebrazos, región anterolateral de brazos, dorso de pies, región anterolateral de piernas, región anterolateral de muslos, cara, región anterior de tórax y

región anterior del abdomen). A pesar de que resulte una valoración dependiente del observador, se ha visto que existe una correlación con el grado de engrosamiento de colágeno en biopsias cutáneas [60]. El error intraobservador es del 2.45 puntos a lo largo del tiempo, por lo que se considera que es significativa una diferencia de 5 puntos en el caso de que la evaluación se por el mismo observador, mientras que la variabilidad interobservador es de 4.6 puntos, por tanto, se considera una diferencia significativa una variación de 9 puntos si la evaluación se realiza por dos evaluadores distintos [59].

Las alteraciones de la pigmentación son más frecuentes en el curso de ES difusa, se presentan como zonas parcheadas de despigmentación, con preservación de la pigmentación perifolicular, lo que da lugar a que se denomine piel en “sal y pimienta”, hecho que lo diferencia del vitíligo que no respeta la pigmentación perifolicular. También se puede dar una hiperpigmentación bronceada parcheada.

Dado que la fibrosis cutánea produce una pérdida de los anejos cutáneos, puede existir una pérdida de folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas ecrinas, lo que se traduce en áreas cutáneas de alopecia, xerosis cutánea e hipohidrosis. Ocasionalmente la piel puede presentar un aspecto rugoso, levemente eritematosa, con pequeñas pápulas pudiendo dar un aspecto en empedrado.

La calcinosis cutis o calcificación distrófica, es el depósito de sales de fosfato cálcico insoluble en el tejido celular subcutáneo, que se observan como pápulas o nódulos blanquecinos subcutáneos, que pueden causar deformidad y dolor. Se localizan con mayor frecuencia en los dedos, antebrazos, codos, pero pueden presentarse en cualquier área sometida a un trauma repetido. En ocasiones cuando están inflamadas

pueden parecer que están sobreinfectadas. Si la calcinosis es muy superficial, su contenido puede fistulizar a la piel espontáneamente con la salida de un material blanquecino similar al yeso [61].

La historia natural de la induración cutánea es la siguiente, presenta un pico máximo de extensión y engrosamiento en torno a 1-3 años del inicio de la enfermedad, manteniéndose estable durante semanas o meses y posteriormente un descenso progresivo lento. Las áreas proximales pueden retornar a presentar una textura normal, sin embargo, en áreas más distales como los dedos no suele regresar. Aunque la induración pueda resolverse, los cambios cutáneos de hiperpigmentación suelen persistir.

1.7.4. Afección musculoesquelética

La afección musculoesquelética de la ES es muy variada, desde la presencia de artralgias o dolores articulares, a la artritis. La artritis erosiva afecta al 18% de pacientes, sin embargo sólo el 2% cumple los criterios clásicos de artritis reumatoide [62], y el patrón que presentan es poliarticular simétrico en el 61%, oligoarticular en 22% y monoarticular en un 17% de los casos. La sinovitis articular es frecuente encontrándose en el 16% de los pacientes según una cohorte del grupo EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR), la cual se puede evidenciar mediante ecografía o resonancia magnética (RM).

Los roces tendinosos, son crepitantes tendinosos a la palpación de los movimientos articulares, predominantemente en muñecas, dedos, codos y región tibial anterior. Se deben al depósito fibrinoso en las vainas tendinosas [63], y están presentes

hasta en el 11% de pacientes, siendo más frecuentes en el grupo de pacientes en la fase inicial de una ES difusa y se han correlacionado con afecciones vasculares, musculares graves, así como con la crisis renal esclerodérmica y una menor supervivencia [64, 65].

Las contracturas tendinosas afectan a pequeñas articulaciones de las manos, interfalángicas proximales y metacarpofalángicas, produciendo una pérdida en la extensión completa de los dedos. Más frecuentemente en la ES difusa, las contracturas pueden afectar a intermedias-grandes articulaciones como las de muñecas, codos, hombros y rodillas, perdiendo la movilidad articular, produciendo gran discapacidad al enfermo.

La afección muscular puede deberse a miopatía no inflamatoria, definida como debilidad en la exploración física, mínima o ninguna elevación de los niveles séricos de creatin quinasa, con un electromiograma y/o biopsia muscular normales. Por el contrario, la miopatía inflamatoria o miositis se define como debilidad muscular con elevación de creatin quinasa, patrón miopático en el electromiograma o signos de miositis en la biopsia muscular. Un estudio en una cohorte de 1095 pacientes ha demostrado que hasta el 17% de los pacientes presentan criterios de miopatía inflamatoria [66]. Recientemente, se han descrito los patrones histológicos en pacientes con ES que presentaban debilidad muscular, objetivando de forma decreciente necrosis (66.7%), inflamación (47.6%), atrofia neurogénica aguda (47.6%) y fibrosis (33.3%) [67]. Así mismo, las técnicas de inmunohistoquímica han mostrado expresión en el sarcolema del complejo mayor de histocompatibilidad I (56%), infiltración de células CD8 positivas (18%), células CD4 positivas (15%) y células CD3 positivas (15%). Los

anticuerpos anti-PM/Scl, anti-Ku, anti-U1RNP y anti-U3RNP se han relacionado con una mayor frecuencia de miopatía inflamatoria [68, 69].

1.7.5. Afección digestiva

El tracto gastrointestinal está afectado de forma casi universal en hasta el 90% de los pacientes, aunque el grado de gravedad varía entre ellos y cualquier tramo del mismo puede estar comprometido [70, 71].

La afección esofágica es la afección orgánica interna más frecuente en la ES, afectando al 70-90% de pacientes. Se manifiesta con clínica de reflujo, dolor retroesternal o disfagia y se diagnostica documentando la hipomotilidad principalmente de cuerpo esofágico y/o hipotonía del esfínter esofágico inferior mediante manometría, tránsito esofágico o estudio isotópico. El reflujo gastroesofágico puede causar esofagitis en el 77% de los pacientes, e incrementa el riesgo de presentar esófago de Barret [72], por lo que la fibrogastroscopia puede estar indicada en algunos casos.

La afección gástrica afecta a un 50% de pacientes, y se manifiesta como saciedad precoz, hinchazón, acidez, náuseas o desconfort abdominal. La hipomotilidad gástrica, se objetiva mediante estudio isotópico o por un tránsito gastrointestinal [73]. La ectasia vascular antral, también conocida como estómago en sandía, se presenta en el 5.6% de los pacientes [74], y causa desde deficiencia de hierro asintomática a sangrado digestivo grave. Se ha relacionado con la presencia de anticuerpos anti-RNA polimerasa III y un mayor riesgo de crisis renal esclerodérmica.

El intestino delgado puede estar comprometido de diversas formas, aunque cuatro síndromes clínicos son los más frecuentes. El sobrecrecimiento bacteriano se presenta en torno al 33-43% de pacientes, como consecuencia de una hipomotilidad digestiva, estasis del contenido alimentario y migración de bacterias colónicas al intestino delgado, con el consiguiente crecimiento, catabolización de sales biliares, carbohidratos y malabsorción de nutrientes [75]. Clínicamente se manifiesta como saciedad precoz, distensión abdominal postprandial, diarrea o flatulencia. Se diagnostica mediante el test del aliento con detección de hidrógeno tras ingestión de glucosa. La malabsorción también puede deberse a una alteración de la superficie intestinal absorbiva, se asocia a déficits nutricionales tanto calóricos, de vitamina B12, hierro, o vitaminas liposolubles, siendo clínicamente indistinguible al sobrecrecimiento bacteriano. El diagnóstico se realiza mediante el test del aliento de hidrógeno tras ingestión de D-xilosa. La pseudoobstrucción intestinal se caracteriza por los síntomas y signos de una obstrucción en ausencia de una lesión que ocluya la luz intestinal, con distensión abdominal, dolor abdominal, náuseas y vómitos, continuados por episodios de diarrea con disminución de la distensión [76]. Se diagnostica mediante la visualización de asas dilatadas de intestino delgado y la presencia de niveles hidroaéreos en la radiografía abdominal simple o en el TC abdominal.

El intestino grueso se afecta en el 20-50% de pacientes, mientras que la afección anorrectal puede alcanzar el 50-70%, como consecuencia de la dismotilidad [77]. El estreñimiento es el síntoma más frecuente y se puede evaluar mediante colonoscopia, manometría colónica o marcadores radioopacos que miden el tiempo de tránsito en el intestino grueso. La disfunción anorrectal se manifiesta en forma de incontinencia fecal,

prolapso rectal o tenesmo, debido a la hipotonía o atrofia esfinteriana, se diagnostica mediante manometría anorrectal y endoecografía principalmente.

La afección hepática más frecuente es la colangitis biliar primaria, encontrándose en el 2-18% de los pacientes con ES [78]. Se asocia a la positividad frente a anticuerpos anti-mitocondriales en el 80-96.5% de los casos y se asocia a los ACA, específicamente frente al antígeno CENP-B. El diagnóstico de sospecha se realiza mediante la elevación de enzimas de colestasis como la fosfatasa alcalina, los niveles de inmunoglobulinas IgM y anticuerpos anti-mitocondriales positivos, estableciendo mediante la biopsia hepática el diagnóstico de certeza.

1.7.6. Afección cardíaca

La frecuencia de la afección cardíaca está en torno al 41-46% [9, 79], aunque puede estar infraestimada, dado que depende de los métodos diagnósticos empleados [80], y de las manifestaciones que se consideren relacionadas con la enfermedad [81].

La afección pericárdica puede variar desde la pericarditis aguda, pericarditis crónica, derrame pericárdico, el taponamiento cardíaco a la pericarditis constrictiva. Aunque la enfermedad pericárdica es frecuente en torno al 33-72% de casos, únicamente es sintomática en 7-20% [82], su evaluación se realiza por ecocardiografía, tomografía computarizada (TC) o RM cardíaca.

La cardiopatía isquémica sin la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular puede ser de pequeño o de gran vaso, clínicamente puede ser asintomática, presentar dolor torácico en contexto de crisis de FR, exposición al frío o al

estrés. La isquemia microvascular se presenta en el 60% de pacientes [83], en forma alteración de la perfusión miocárdica mediante SPECT de ejercicio, con estimulación con frío o con dipiridamol, así como mediante la RM cardíaca.

La disfunción diastólica del ventrículo izquierdo se presenta en el 30-35% de los casos, mientras que la disfunción sistólica del ventrículo izquierdo definida por una fracción de eyección menor al 50%, aparece en el 5.4% de los pacientes. La primera se evalúa mediante ecocardiografía con Doppler tisular o ecografía Doppler normal, la segunda a través de la ecocardiografía, ventriculografía isotópica o RM cardíaca. La disfunción primaria del ventrículo derecho definida como una fracción de eyección menor al 40% puede alcanzar el 38%, siendo estudiada por ecocardiografía con Doppler tisular, ventriculografía isotópica o RM cardíaca.

La miocardiopatía esclerodérmica es poco frecuente, puede mostrarse en forma de focos fibróticos en bandas, miocardiopatía restrictiva o incluso dilatada. Se manifiesta en forma de insuficiencia cardíaca o arritmias. Se diagnostica con la ecocardiografía, el cateterismo derecho y/o la RM cardíaca.

Las alteraciones del sistema de conducción pueden presentarse como palpitaciones, síncope o incluso muerte súbita. La detección de bradiarritmias y taquiarritmias se determina mediante electrocardiograma-Holter de 24 horas y se han asociado a un aumento de la mortalidad [84].

1.7.7. Crisis renal esclerodérmica

La crisis renal esclerodérmica está definida como microangiopatía trombótica con una hipertensión arterial reciente y/o insuficiencia renal aguda oligúrica [85, 86]. Clínicamente se presenta como hipertensión, cefalea, anemia hemolítica o insuficiencia cardíaca. Se estima una frecuencia del 10-15% entre los pacientes con ES difusa frente al 1-2% en el subtipo de ES limitada [87, 88]. Los factores asociados a su desarrollo son la presencia de ES difusa, la rápida progresión de la induración cutánea, una ES de menos de 4 años de evolución, la raza afro-americana, la positividad de anticuerpos anti-RNA polimerasa III, el desarrollo de derrame pericárdico, nueva anemia y ciertos fármacos como el tratamiento con dosis de prednisona superiores a 15mg/día, anticalcineurínicos y diuréticos. Gracias a la introducción en el tratamiento de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina ya no es la primera causa de muerte en los pacientes con ES [89].

1.7.8. Afección respiratoria

La afección respiratoria se encuentra presente en gran parte de los pacientes con ES, en forma de enfermedad pulmonar intersticial y/o hipertensión pulmonar, suponiendo actualmente la primera causa de muerte, siendo responsable del 41.9% de los fallecimientos [89-91].

Debido a la importancia de esta alteración orgánica para el presente trabajo, se describirá de forma detallada en el apartado siguiente.

**2. AFECCIÓN PULMONAR
ASOCIADA A LA
ESCLERODERMIA**

2.1. Enfermedad pulmonar intersticial (EPI)

La fibrosis pulmonar o EPI se encuentra hasta en el 74% de los pacientes según estudios necrópsicos [92]. Sin embargo, se evidencia entre el 55-65% de los pacientes según los métodos diagnósticos actuales [93], pero sólo en un 25-30% llega a ser esta afección clínicamente relevante. La EPI se establece en los primeros 4-6 años del inicio de la enfermedad. Se manifiesta en forma de disnea progresiva o tos seca, y a la exploración física se documentan crepitantes secos de predominio en bases pulmonares. Los anticuerpos anti-Scl-70 se han asociado a una EPI más agresiva [94], así como el subtipo cutáneo ES difusa se ha correlacionado con una peor evolución clínica de la EPI [95].

Actualmente el diagnóstico se realiza mediante el TC pulmonar de alta resolución (TACAR). El patrón observado más frecuente es la combinación de opacidades en vidrio deslustrado y reticulación fina, características de la neumopatía intersticial no específica (NINE). Así mismo se han propuesto esquemas de estratificación simplificados basados en la definición de enfermedad extensa, cuando la extensión de la fibrosis supera el 20% en el TACAR o bien si ésta es indeterminada si la capacidad vital forzada (FVC) es inferior al 70% [96, 97]. El grado de extensión de la enfermedad se calcula mediante la media del valor más cercano al 5% en cada uno de cinco cortes (origen de grandes vasos, carina, confluencia de venas pulmonares, a mitad del corte tercero y quinto, e inmediatamente superior al hemidiafragma derecho) [96].

Las PFR se utilizan durante el seguimiento de un paciente con EPI, dado que presentan alta predicción de la evolución de la EPI, demostrando un incremento de la mortalidad cuando los pacientes presentan una EPI restrictiva grave, definida por una

FVC <50% o bien cuando la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO) es inferior al 40% [98, 99]. En general la fibrosis pulmonar está caracterizada por presentar un patrón espirométrico restrictivo, con reducción de la FVC e incremento del cociente entre el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) y la FVC, junto con una reducción de la DLCO. Los valores de DLCO en la EPI normalmente son inferiores a los volúmenes pulmonares, debido al impacto del proceso fibroso sobre la vascularización pulmonar. La variación significativa en las PFR se considera siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Torácica Americana (ATS) y la Sociedad Europea de Respiratorio (ERS) [100, 101] para las neumopatías intersticiales. Así, la mejoría viene definida como un incremento $\geq 10\%$ en la FVC, el empeoramiento si existe un descenso $\geq 10\%$ en la FVC y la estabilización si la variación no supera dichos extremos [102]. La supervivencia libre de progresión (SLP) de la enfermedad, se define de manera similar a como se define en los ensayos clínicos de la fibrosis pulmonar idiopática: como el período de tiempo transcurrido hasta el punto en el que desciende la FVC al menos un 10% o bien fallece el paciente [103, 104]. La supervivencia libre de enfermedad restrictiva grave se define como el tiempo transcurrido hasta desarrollar una FVC inferior al 50% o bien el fallecimiento.

En un estudio muy reciente se ha valorado el importante poder predictivo de la evolución de las PFR en los 2 primeros años de la EPI sobre la mortalidad de la misma [105]. Dentro de los primeros 12 meses, los factores asociados a mayor mortalidad son: el descenso $\geq 10\%$ en la FVC (HR: 1.84 en la cohorte global) y la variable combinada denominada descenso categórico compuesto (formada por un descenso $\geq 10\%$ en la FVC o bien un descenso moderado del 5-9% junto con un descenso $\geq 15\%$ en la DLCO) (HR: 1.96 en la cohorte global) [106]. A los 24 meses, se asocia a una mayor mortalidad

un descenso $\geq 10\%$ del cociente de la DLCO entre el volumen alveolar (KCO) (HR: 2.35 en la cohorte global). Estos resultados obtenidos en el estudio univariante, se confirman al completar el estudio multivariante según los datos evaluables a los 12 meses, siendo los factores determinantes de la mortalidad a largo plazo en los pacientes con EPI, la edad al diagnóstico (HR: 1.03), la enfermedad extensa en el TACAR basal (HR: 2.30), la presencia de HP (HR: 2.05) definida como una presión arterial pulmonar sistólica (PAPs) ≥ 40 mmHg estimada mediante ecocardiografía Doppler, la KCO basal (HR: 0.98) y la variable de descenso categórico compuesto (HR: 2.25). El estudio multivariante con datos a 24 meses, confirma de nuevo el papel de la edad (HR: 1.05), la enfermedad extensa en el TACAR basal (HR: 2.76), la KCO basal (HR: 0.97), el descenso de la KCO $\geq 10\%$ (HR: 2.46) y el desarrollo de un descenso categórico compuesto (HR: 2.25). De este modo, se observa que en el primer año tiene gran valor el descenso de la FVC o su variable combinada y a los dos años de enfermedad tiene más importancia el descenso de la difusión sobre la FVC por sí misma, lo cual parece indicar que la mortalidad en la EPI asociada a la ES no sólo se debe a una progresión de la EPI sino a una progresión de la vasculopatía pulmonar no atribuible a la EPI.

Se ha descrito un aumento de células inflamatorias en el lavado broncoalveolar de los pacientes con EPI-ES [107, 108], definiendo el término alveolitis cuando se objetiva un aumento de linfocitos $\geq 15\%$, y/o neutrófilos $\geq 5\%$, y/o eosinófilos $\geq 5\%$ [109]. Sin embargo, no existe una correlación entre los resultados del lavado broncoalveolar y la supervivencia a largo plazo o la progresión de la enfermedad [104], por lo que únicamente se utiliza el lavado broncoalveolar para excluir procesos infecciosos o bien con fines de investigación [110].

Los resultados negativos de la fibrobroncoscopia y el creciente interés de encontrar factores que se correlacionen con la progresión de la EPI a largo plazo, ha promovido la realización de estudios en busca de múltiples biomarcadores obtenidos por métodos no invasivos. Recientemente, se ha relacionado los niveles elevados de IL-6 en el suero de pacientes con EPI-ES, con una peor supervivencia, específicamente en aquellos con una afección leve-moderada según el TACAR [111].

La medición de biomarcadores en las vías respiratorias puede ser de utilidad tanto para estudiar el proceso patogénico que ocurre en el tejido pulmonar como para determinar su posible valor pronóstico. De este modo, se ha confirmado el aumento de citoquinas como el IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-4, IL2, e IL-10 en el condensado de aire exhalado (CAE) de pacientes con ES frente a controles sanos, siendo la IL-4 la citoquina con mayor poder discriminativo entre ambos [112]. A su vez, todas las citoquinas se han correlacionado de forma negativa con la capacidad pulmonar total y la DLCO, pero sin diferenciar entre pacientes con o sin EPI. Paralelamente, se ha objetivado que los pacientes con ES presentan mayores niveles de cisteinil-leucotrienos y 8-isoprostano respecto a controles, lo cual puede reflejar el aumento de moléculas proinflamatorias y profibróticas, así como de productos de la peroxidación por radicales libres sobre el ácido araquidónico, existentes en las vías respiratorias de estos pacientes [113]. Sin embargo, no se ha demostrado su correlación con los parámetros pulmonares ni con los hallazgos sugestivos de fibrosis en el TACAR.

Trabajos más recientes se han enfocado en el estudio del óxido nítrico (NO) en aire exhalado (AE). Estudios valorando la fracción exhalada de NO (FeNO), han mostrado niveles de NO más elevados en pacientes con ES sin EPI respecto a pacientes

sin fibrosis pulmonar [114, 115]. Wuttge *et al.* confirmaron que la concentración alveolar de NO exhalada (CaNO) está aumentada en los pacientes con ES temprana comparada con la de individuos sanos, sin encontrar diferencias entre los pacientes con EPI-ES respecto a los pacientes con ES sin EPI, aunque se correlaciona débilmente con la extensión del vidrio deslustrado y de las reticulaciones del TACAR [116]. Otros autores han relacionado valores de CaNO superiores a 8.5 ppb en los pacientes con EPI-ES con una respuesta favorable al tratamiento con ciclofosfamida intravenosa frente a una menor tasa de respuesta en los pacientes con niveles bajos, indicando de este modo los pacientes con mayor opción de beneficio a este tratamiento [117].

El estudio del esputo inducido también es de utilidad en la ES, mostrando una correlación negativa entre el recuento celular total y la DLCO tanto en los pacientes con EPI, como en los que no presentan ningún tipo de afección pulmonar, pero no encontrándose tales diferencias en el grupo de pacientes con HAP [118]. Este hallazgo pudiera sugerir el empleo del esputo inducido para la detección de alteraciones incipientes indicativas de una afección pulmonar intersticial subclínica en el grupo de enfermos con ES y DLCO baja.

Sin duda el estudio de la EPI asociada a ES es fundamental porque además de afectar a un número importante de enfermos tiene una implicación en el pronóstico ya que la EPI aislada o asociada a HP es responsable del 25.3% de las causas de muerte, convirtiéndose en la segunda causa de muerte más frecuente en los pacientes con ES [90].

2.2. Hipertensión arterial pulmonar (HAP)

La HAP es una de las complicaciones más graves en el curso de la evolución de los pacientes con ES, cuya prevalencia es del 10% diagnosticada mediante cateterismo cardíaco derecho (CCD) [119, 120]. Además es la causa más importante de muerte de los pacientes [89, 90, 121], siendo la supervivencia de esta entidad en torno al 51% a los 5 años del diagnóstico incluso en la era después de la introducción de nuevos agentes vasodilatadores específicos [122]. La HAP se presenta más frecuentemente a partir de los 4-6 años de enfermedad, en cualquier subtipo cutáneo tanto en la ES difusa, limitada como *sine* esclerodermia [123]. Clínicamente se puede presentar como disnea progresiva, dolor torácico, síncope o con signos de insuficiencia cardíaca derecha.

Aunque para el diagnóstico de sospecha de HP se utiliza la ecocardiografía Doppler para la estimación de la PAPs, para el diagnóstico de certeza es obligatoria la realización de un CCD. De este modo, la HP es un parámetro hemodinámico y se define como la presión arterial pulmonar media (PAPm) ≥ 25 mmHg en el CCD. Una vez diagnosticada, se clasifica en diversos grupos dependiendo de la etiología implicada, teniendo en cuenta que la ES puede presentar HP dentro de cualquier grupo de la clasificación debido a la diversidad de sus afecciones orgánicas. El grupo 1 o HAP, es el definido por presentar una presión de arteria pulmonar enclavada o presión capilar pulmonar (PCP) ≤ 15 mmHg (HP precapilar) y unas resistencias vasculares pulmonares > 3 unidades Wood [124]. El grupo 2 o HP asociada a patología cardíaca izquierda presenta una PCP > 15 mmHg (HP postcapilar). El grupo 3 o HP asociada a enfermedad pulmonar, y en el caso concreto de la ES, asociado a la EPI, se define como PCP ≤ 15 mmHg y EPI moderada-grave con una FVC $< 60\%$ o con una extensión moderada-grave de la fibrosis pulmonar en el TACAR [125]. El grupo 4 o HP asociada a

enfermedad tromboembólica crónica. Existe un grupo de pacientes que no cumplen con los criterios de definición de HP pero que tienen un riesgo aumentado de desarrollar HP a lo largo de la evolución y que se caracterizan por presentar HP limítrofe definida por PAPm entre 21 y 24 mmHg, con una PCP \leq 15 mmHg y sin EPI o con EPI leve (FVC > 60%) [126].

Los siguientes factores se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollar HAP en pacientes con ES: el descenso de la DLCO, el cociente entre FVC/DLCO > 1.6, la presencia de ACA, la enfermedad de larga evolución y la elevación de la porción amino terminal del propéptido natriurético cerebral (NT-proBNP) [127-130].

A pesar de ser la ES un reconocido factor de riesgo de la HAP, sigue existiendo un retraso diagnóstico, ya que según determinadas series más del 80% de los pacientes se diagnostican con clases funcionales III – IV de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [122, 131, 132]. Si se pretende modificar el curso natural de la HAP, es fundamental llevar a cabo medidas para un diagnóstico temprano de esta grave complicación en fases presintomáticas o paucisintomáticas, con el fin de evitar que el gasto cardíaco se deteriore y el corazón derecho claudique como consecuencia del aumento de las resistencias vasculares pulmonares y del aumento de la presión arterial a nivel pulmonar [133].

Con el propósito de demostrar la eficacia de un diagnóstico precoz, un estudio multicéntrico francés propuso una estrategia de cribaje utilizando la ecocardiografía Doppler en una cohorte de enfermos con ES y comparó la supervivencia con la cohorte de práctica clínica habitual a la que se había realizado el diagnóstico de HAP al

presentar síntomas [134]. De acuerdo a este método, los pacientes con una velocidad de regurgitación tricuspídea (VRT) > 3 m/s o los pacientes con una VRT entre 2.5-3 m/s que tuvieran disnea no explicada por otras causas, se les refería a la realización de un CCD ante la sospecha de HAP. Varios años más tarde, los autores compararon las características clínicas de los pacientes diagnosticados de HAP siguiendo este modo de detección frente a los pacientes diagnosticados por la práctica clínica realizada hasta el momento [135]. Se objetivaba que el 50% de los pacientes de la cohorte de detección precoz presentaban una clase funcional I-II de la OMS frente al 12.5% de la cohorte de práctica clínica. Además, se demostró que el grupo diagnosticado por práctica clínica presentaba peor supervivencia (HR: 4.15), siendo del 25% a 5 años del diagnóstico de HAP frente al 73% en el grupo de detección precoz.

Recientemente, el registro estadounidense Pulmonary Hypertension Assessment and Recognition of Outcomes in Scleroderma (PHAROS), inició un estudio multicéntrico, prospectivo en pacientes de reciente diagnóstico (menor de 6 meses) o con riesgo de desarrollar HAP (pre-HAP). Los pacientes con pre-HAP deben cumplir al menos uno de los siguientes criterios: 1) PAPs estimada por ecocardiograma transtorácico ≥ 40 mmHg (calculado como el gradiente de presión entre el ventrículo derecho y la aurícula derecha utilizando la velocidad máxima de la regurgitación tricuspídea más la presión de la aurícula derecha. 2) FVC $> 70\%$ del valor esperado y DLCO $< 55\%$ del esperado o 3) Ratio %FVC/%DLCO > 1.6 [136]. A todos los enfermos se les realiza anualmente, como mínimo, ecocardiografía y PFR. Los pacientes con pre-HP pueden ser reclasificados como PAH definitiva basándose en la realización del CCD durante el curso del estudio. El CCD se realizaba según criterio médico sin un algoritmo determinado. Posteriormente, se analizaron 131 pacientes con

HAP incidental diagnosticada por CCD con una mediana de seguimiento de 2 años, cuya supervivencia acumulada a 1, 2 y 3 años fue del 93%, 88% y 75% respectivamente. El 56.3% de pacientes presentaba clases funcionales I o II de la OMS, mientras que el 38.3% presentó una clase funcional III y sólo un 5.5% una clase IV. Los autores evidenciaron que los factores predictores de una mayor mortalidad fueron la presencia de una edad mayor a 60 años (HR: 3.0), el sexo masculino (HR: 3.9), una clase funcional IV de la OMS (HR: 6.5) y una DLCO < 39% (HR: 4.2%). Se desprende de nuevo que un diagnóstico de HAP precoz, evita que el paciente se encuentre en clases funcionales avanzadas y por lo tanto tiene un impacto favorable en la supervivencia.

La Sociedad de Cardiología Europea y la Sociedad Europea de Respiratorio (ESC/ERS) publicaron en el año 2009 una serie de recomendaciones basadas en consensos para el diagnóstico precoz de la HAP, usando principalmente la presencia de síntomas y el hallazgo de alteraciones en la ecocardiografía [137]. Las guías ESC/ERS del 2009 recomendaban la realización del cribaje para la detección de HP en pacientes con ES mediante ecocardiografía en pacientes sintomáticos con una recomendación I, con nivel de evidencia B y en el caso de pacientes asintomáticos se indicaba con una clase de recomendación IIb con nivel de evidencia C. Por lo tanto no se aconsejaba realizar una detección activa en los enfermos asintomáticos. Por otra parte se recomendaba la realización del CCD en tres supuestos 1) si la VRT es > 3.4 m/s; 2) si la VRT se encuentra entre > 2.8 – ≤ 3.4 m/s y el paciente presenta síntomas (disnea o fatiga desproporcionada, dolor torácico, pre-síncope o signos de fallo cardíaco derecho); o 3) si la VRT ≤ 2.8 m/s con la presencia de síntomas y signos ecocardiográficos adicionales de HP.

El Australian Scleroderma Interest Group (ASIG) diseñó un algoritmo basado en las PFR y el valor del NT-proBNP para referir a los pacientes a la ecocardiografía y según los resultados de la misma, ser enviados al CCD [138]. Sin embargo, para la elaboración de este estudio únicamente se estudiaron las características de 4 grupos de pacientes entre los que se incluyeron, 15 pacientes con HAP diagnosticada por CCD, 30 pacientes con riesgo de desarrollar HAP de los cuales sólo a 9 se les practicó el CCD, 19 pacientes con EPI y 30 controles. Tampoco se establecieron los valores de la ecocardiografía a partir de los cuales se debía referir al paciente al CCD.

Al mismo tiempo, fue publicado el primer algoritmo basado en la evidencia para el cribaje de HAP en la ES, denominado DETECT [125]. La finalidad del algoritmo DETECT fue desarrollar una herramienta para identificar a los pacientes con HAP en estadíos asintomáticos a través de determinadas variables clínicas, PFR, inmunológicas, de laboratorio, electrocardiográficas y finalmente ecocardiográficas, según las cuales se debiera referir al paciente a la realización del CCD para su confirmación. Para su elaboración se realizó de forma sistemática un CCD en 466 pacientes que debían presentar al menos más de 3 años de duración de la ES desde el primer síntoma diferente al FR y una DLCO < 60%. Fueron excluidos los pacientes ya diagnosticados previamente de HP mediante CCD, los que mostraban FVC < 40% o si presentaban insuficiencia renal o cardiopatía izquierda clínicamente relevante, insuficiencia renal crónica o embarazo. Tras la recogida de hasta 112 variables diferentes, se seleccionaron 8 variables por regresión multivariante, llegando a elaborar un algoritmo en dos fases, una primera fase correspondiente a parámetros clínicos (presencia de telangiectasias), PFR (cociente FVC/DLCO), de laboratorio (positividad a ACA, niveles de ácido úrico y niveles de NT-proBNP en sangre) y electrocardiográficas (desviación del eje cardíaco a

la derecha). Según la puntuación de dicha primera fase se pasa a realizar el ecocardiograma con medición del área de aurícula derecha y de la VRT. Según la suma de todas las puntuaciones obtenidas se remite al enfermo a la realización del CCD. En el propio trabajo, los autores demostraron que el algoritmo DETECT presentaba una sensibilidad del 96% para la detección de HAP, mientras que era del 71% utilizando las guías ESC/ERS del 2009, con una especificidad del 48% frente al 69%, respectivamente. Una de las limitaciones del estudio es que no se establece la periodicidad con la que se deben evaluar los enfermos con ES mediante dicho algoritmo, ni tampoco ha sido validado en cohortes externas.

Además de los factores asociados a mayor riesgo de HAP comentados previamente el hallazgo de una HP limítrofe en el primer CCD es también un factor de alto riesgo para desarrollar una HP establecida comparado con los pacientes con una $\text{PAPm} < 21 \text{ mmHg}$ presentando una HR de 3.7 durante el período de seguimiento [139].

En base a los estudios comentados un grupo de expertos realizaron unas recomendaciones para detectar la HAP de manera precoz. Se aconseja realizar un cribaje de HAP en todos los pacientes con ES (grado de recomendación moderado). Si se observan alteraciones en los métodos no invasivos debe de valorarse la realización de CCD (grado de recomendación alto) dado que la práctica de CCD es obligatoria para el diagnóstico de HAP (grado de recomendación alto) [140]. Como métodos de cribaje inicial se indicaban con un alto grado de recomendación la realización de PFR con DLCO y/o la ecocardiografía Doppler transtorácica, y con un grado moderado de recomendación la determinación del NT-proBNP y/o la aplicación del algoritmo DETECT si se cumplían los criterios de inclusión del estudio. En cuanto a la frecuencia

en la realización de los test no invasivos se recomendaba con un grado bajo la realización de una ecocardiografía, PFR con DLCO y/o NT-proBNP anualmente así como repetirlos en el momento en que apareciesen signos o síntomas nuevos: la realización de una ecocardiografía tenía un grado de recomendación alto y/o PFR con DLCO presentaba un grado de recomendación bajo. En cuanto a las recomendaciones respecto a cuando enviar a un paciente con ES a la realización del CCD se valoraban tres situaciones dependiendo de la herramienta de cribaje. En el caso de utilizar la ecocardiografía, presentaba una alta calidad de evidencia referir al CCD a los pacientes asintomáticos con una VRT > 2.8 m/s o con dilatación de cavidades derechas (aurícula derecha > 53 mm o ventrículo derecho > 35 mm) independientemente de la VRT y a los pacientes sintomáticos con una VRT entre 2.5 – 2.8 m/s. En caso de que por ecocardiografía no se evidenciara una disfunción sistólica de ventrículo izquierdo evidente, una disfunción diastólica de ventrículo izquierdo mayor a grado I, una insuficiencia mitral o aórtica moderada o grave o signos de HP, presentaba una calidad de evidencia alta referir al CCD a los casos sintomáticos con cociente FVC/DLCO > 1.6 y/o DLCO < 60% y a los casos asintomáticos un cociente FVC/DLCO > 1.6 y/o DLCO < 60% con un valor de NT-proBNP >2 veces el límite superior de la normalidad. En caso de que la ecocardiografía no pusiera de manifiesto los supuestos previos, el grado de calidad de evidencia era moderado para referir al CCD en los pacientes asintomáticos que cumplían con los requisitos de inclusión del algoritmo DETECT y según el resultado de su aplicación se recomendara el CCD

Recientemente, se han publicado las guías sobre diagnóstico y tratamiento actualizadas de la ESC/ERS en el año 2015 [124], donde se especifica que la ecocardiografía de reposo es el test de cribaje recomendado en pacientes asintomáticos

con ES (recomendación I y nivel de evidencia B), seguido de cribaje anual mediante ecocardiografía, DLCO y biomarcadores, presentando una clase de recomendación IIb y un nivel de evidencia B. Además se recomienda el CCD en todos los casos de sospecha de HAP con una clase de recomendación I y un nivel de evidencia C. Los pacientes con una HP limítrofe entre 21-24 mmHg deben ser monitorizados estrechamente por el riesgo aumentado de desarrollar HAP establecida (clase de recomendación IIa y un nivel de evidencia B). El uso del algoritmo DETECT se indica si se cumplen los criterios de inclusión (clase de recomendación IIb y un nivel de evidencia B).

Las probabilidades de la HP se basan en los resultados de la ecocardiografía, definiendo probabilidad baja de HP como $VRT \leq 2.8$ m/s o no medible, sin otros signos indirectos de HP. La probabilidad intermedia de HP se identifica como $VRT \leq 2.8$ m/s o no medible con signos indirectos de HP, o una VRT entre 2.9 – 3.4 m/s sin otros signos indirectos de HP. La probabilidad alta se considera si la VRT se encuentra entre 2.9 – 3.4 m/s con otros signos indirectos de HP, o una $VRT > 3.4$ m/s.

En cuanto a la remisión para la realización del CCD en pacientes con ES depende de la probabilidad de la ecocardiografía y de la clínica asociada. (ver tabla 7)

Tabla 7. Recomendaciones del ESC/ERS 2015 para el diagnóstico de la HAP-ES

Probabilidad HP según eco	Recomendación	Clase de recomendación	Nivel de evidencia
Pacientes con ES asintomáticos			
Baja	Podría considerarse ecocardiografía durante el seguimiento	IIb	C
Intermedia	El CCD debe ser considerado	IIa	B
Alta	El CCD está recomendado	I	C
Pacientes con ES sintomáticos			
Baja	Podría considerarse ecocardiografía durante el seguimiento	IIa	C
Intermedia	Valoraciones más amplias de HP incluyendo el CCD deben ser consideradas	IIa	B
Alta	La investigación de la HP incluyendo el CCD son necesarios	I	C
ES: esclerodermia sistémica, HP: hipertensión pulmonar; CCD: cateterismo cardíaco derecho			

3. EL VALOR DE LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE ESCLERODERMIA

Los ANAs son la marca distintiva de las enfermedades autoinmunes, y en el caso de la esclerodermia están presentes en el 95% de los pacientes. Aunque el papel de los auto-anticuerpos en la patogenia de la ES no está clara, existe gran evidencia sobre la importancia de los mismos tanto para el diagnóstico como para su pronóstico [68, 141].

Se han descrito hasta 9 anticuerpos específicos de la ES en comparación con otros que son menos frecuentes y no específicos o sin significado clínico. Los anticuerpos específicos son infrecuentes en otras conectivopatías y mucho menos frecuentes en procesos no inmunes. Característicamente se presentan antes del inicio de los síntomas de la ES y no cambian durante el curso de la enfermedad y casi siempre son excluyentes [142]. La diana antigénica de los anticuerpos son componentes intranucleares, incluyendo proteínas del kinetocoro, ribonucleoproteínas, y enzimas como la topoisomerasa o la RNA polimerasa. Determinados anticuerpos como ACA, anti-Scl-70 y anti-RNA polimerasa III son completamente específicos de la ES y suficientemente frecuentes, lo que ha permitido que se hayan incorporado en los nuevos criterios clasificatorios del ACR/EULAR de 2013 [7].

La amplia variedad de anticuerpos específicos y su correlación con determinadas manifestaciones clínicas les hace que sea muy importante su determinación. En la tabla 8 se recogen los principales anticuerpos y las manifestaciones clínicas a las que más frecuente se asocian [68, 69, 143].

De este modo, existen 5 anticuerpos asociados de forma predominante a ES limitada (ACA, anti-Th/To, anti-U1RNP, anti-PM/Scl y anti-Ku), 3 anticuerpos asociados fundamentalmente a ES difusa (anti-Scl-70, anti-RNA polimerasa III y anti-

U3RNP), y recientemente se ha descrito otro anticuerpo anti-U11/U12 RNP que se presenta por igual como ES limitada o difusa.

Tabla 8. Anticuerpos específicos de ES y afecciones orgánicas

	ACA	Scl-70	RNA Pol III	Th/To	U3RNP	U1RNP	PM/Scl	Ku	U11/U12 RNP
ES difusa, %	5	71	85	7	64	20	22	14	48
Articular, %	60	86	88	60	89	94	75	50	79
Úlceras digitales, %	61	63	42	29	58	49	47	29	-
Miositis, %	1	9	4	6	18	27	58	43	6
Digestiva grave, %	8	8	5	13	25	14	0	-	-
Pulmonar, %	45	73	49	62	67	53	58	57	79
EPI grave, %	6	23	7	16	24	22	27	36	-
HAP, %	19	2	6	32	24	14	3	9	0
Crisis Renal, %	1	10	28	4	7	7	4	0	6
Cardiaca grave, %	4	16	7	7	18	11	6	9	24
Supervivencia 10 años, %	76	65	75	58	61	88	72	-	66

Los ANA son actualmente determinados mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando la línea celular HEp-2 derivada de carcinoma de laringe, sustrato que permite discernir mejor las diferentes estructuras celulares (membrana nuclear, nucleoplasma, nucleolo, aparato de Golgi, ribosomas, mitocondrias y fibras de citoesqueleto) [144]. Se considera positiva, la reactividad a nivel del núcleo con diluciones del suero del paciente $\geq 1:80$ si el patrón de IFI encontrado es un nucleolar y $\geq 1:160$ en el resto de patrones visualizados. Los patrones de IFI observados se correlacionan con los antígenos diana frente a los que los anticuerpos se encuentran dirigidos. Así, los patrones de IFI más prevalentes en los pacientes con ES son: patrón centromérico (es el único patrón específico o ACA), homogéneo, nucleolar y moteado.

Hay que tener en cuenta que existen determinados antígenos que se encuentran localizados de forma predominante en el citoplasma, de esta manera pacientes con anticuerpos dirigidos frente a éstos pueden presentar ANAs negativos, es el caso de los anti-Ro, anti-La, anti-mitocondriales y anti-sintetasas de RNAt.

3.1. Anticuerpo anti-centrómero (ACA)

Es el anticuerpo más frecuente objetivado en los pacientes con ES (16-39%). Es el único anticuerpo que presenta un patrón de IFI específico, el centromérico. Las proteínas antigenicas diana son diferentes proteínas del kinetocoro llamadas CENP A, B y C, siendo la proteína B de 80 kDa la diana principal. Existen técnicas de enzimoinmunoensayo (ELISA), e inmunoblot comerciales que utilizan estos sustratos antigenicos para su determinación. El ACA está altamente relacionado con el desarrollo de una ES limitada, sólo el 5% presentan una ES difusa. Es el anticuerpo más frecuentemente encontrado en los pacientes con HAP [145], sin embargo, no se ha demostrado una mayor frecuencia de HAP respecto a los pacientes con anti-Scl-70, los cuales sí presentan una mayor prevalencia de HP asociada a fibrosis pulmonar [52]. También se ha descrito que los ACA pueden conferir una cierta protección relativa frente a la EPI y a la crisis renal esclerodérmica [52, 146-148], por el contrario, confiere un mayor riesgo de presentar colangitis biliar primaria [149].

3.2. Anticuerpo anti-Scl-70 o anti-topoisomerasa I

Es el segundo anticuerpo en frecuencia (9-39%). El antígeno diana es la enzima topoisomerasa I, descrito en la inmunoprecipitación como una banda de 70 kDa que en realidad es un producto de degradación de la proteína. El patrón que presenta en la IFI es un nuclear moteado fino y con frecuencia con una zona acentuada positiva nucleolar

[144]. Para su diagnóstico se emplean técnicas comerciales de ELISA, ALBIA, quimioluminiscencia, doble inmunodifusión, e inmunoblot en línea, aunque también se puede determinar por inmunoprecipitación. Se asocia al subtipo cutáneo difusa, a mayor prevalencia de UD, afección musculoesquelética, cardíaca y crisis renal, así como a mayor frecuencia de EPI y trastorno restrictivo grave secundariamente [52, 99, 146]. Del mismo modo se ha relacionado con una mayor mortalidad [94, 150].

3.3. Anticuerpo anti-RNA polimerasa III

Según los resultados de un reciente meta-análisis está presente en el 4-25% de los pacientes, su prevalencia varía según la zona geográfica estudiada desde el 7% en Asia, 9% en Europa y 14% en América del Norte, 15% en Oceanía y 41% en Sudamérica [151]. El antígeno diana es la RNA polimerasa III, aunque comúnmente estos anticuerpos también se asocian a anticuerpos frente anti-RNA polimerasa I y/o II. El patrón de la IFI no es específico predominando el nucleolar. Existen comercializados ELISA e inmunoblot en línea, pudiéndose determinar también por inmunoprecipitación. Los enfermos con este anticuerpo presentan predominantemente subtipo cutáneo ES difusa y más prevalencia de ectasias vasculares antrales gástricas [152]. Además se ha asociado con alto riesgo de desarrollar una crisis renal esclerodérmica, de hecho, el 59% de los pacientes con crisis renal son positivos para este anticuerpo [148]. Recientemente se ha asociado a un mayor riesgo de cáncer de forma sincrónica, específicamente en los 3 años dentro del diagnóstico de la ES [153, 154]. En algunos casos con neoplasia asociados a este anticuerpo, se han descrito alteraciones genéticas somáticas en el locus del gen responsable de la transcripción de la RNA polimerasa III (POLR3A), sugiriendo que dicha mutación pudiera desencadenar la capacidad inmunogénica de este antígeno e iniciar la producción de anticuerpos [155].

3.4. Anticuerpo anti-Th/To

Se ha descrito una prevalencia del 1-7%, siendo su antígeno diana pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (RNPs), componentes de la RNasa MRP y RNasa P [156]. En la IFI típicamente muestran un patrón punteado nucleolar. Existen métodos de detección comercial por inmunoblot en línea o bien por inmunoprecipitación. Se relaciona de forma predominante con subtipo ES limitada. Característicamente tiene un riesgo aumentado de HAP, así como de presentar EPI, aunque menos vasculopatía digital y un peor pronóstico [157]. Recientemente se ha destacado como un posible anticuerpo implicado en la identificación de pacientes con ES *sine* esclerodermia catalogados hasta el momento como fibrosis pulmonar idiopática [158].

3.5. Anticuerpo anti-U3RNP o anti-fibrilarina

Se le atribuye una frecuencia del 1-6%, cuyo antígeno diana es el complejo macromolecular denominado fibrilarina, una ribonucleoproteína pequeña nucleolar (RNPsno), cuyos componentes proteicos están unidos al RNA nucleolar pequeño U3. La IFI se caracteriza por presentar un patrón nucleolar grumoso, sin embargo su confirmación sigue siendo un reto, porque aunque existen técnicas comerciales para su identificación mediante inmunoblot en línea, el antígeno es difícil de adaptarse a la plataforma de diagnóstico, probablemente porque se modifica ampliamente su conformación tridimensional y por ello, deja de ser reconocible por los auto-anticuerpos [159]. Así, lo más adecuado es la utilización de la inmunoprecipitación para su diagnóstico o confirmación. Se asocia frecuentemente al subtipo ES difusa, enfermedad más grave, afectación digestiva y muscular importante, hasta el 25-33% de estos pacientes presentan debilidad muscular y uno de los tres siguientes: elevación de enzimas musculares, cambios miopáticos en el electromiograma o evidencia de miositis

en la biopsia muscular [160, 161]. Tiene más prevalencia en el sexo masculino y comporta un mayor riesgo de HAP. También existe una asociación con raza negra, y con un peor pronóstico en estos pacientes, con una menor edad al inicio de la ES, mayor frecuencia de UD, pericarditis, afección digestiva, aunque con un compromiso pulmonar menos grave [161].

3.6. Anticuerpo anti-U1RNP

Se le atribuye una frecuencia del 5-35%. Su diana antigénica es el complejo macromolecular de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPs), que intervienen en el procesamiento del RNA heterogéneo nuclear a RNA mensajero [162]. La IFI muestra un patrón nucleoplasmático granular grueso, pero para su confirmación se emplean técnicas de ELISA, ALBIA e inmunoblot en línea, aunque también se puede utilizar la inmunoprecipitación. Clínicamente se asocia a subtipo ES limitada, frecuentemente se encuentra asociada a síndromes de solapamiento con lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide o miositis, e incluso algunos de los pacientes cumplen criterios de la enfermedad mixta de tejido conectivo. De este modo, muchos asocian otros anticuerpos anti-Ro/SSA, anti-La/SSB y anti-Smith [141, 163]. Este anticuerpo también se ha asociado a HAP, con tendencia a presentar un mejor pronóstico que los pacientes con HAP sin este anticuerpo [164].

3.7. Anticuerpo anti-PM/Scl

Están presentes en el 0-6 % de casos de ES, se encuentran dirigidos frente al complejo molecular compuesto por hasta 16 proteínas que conforman el exosoma humano, si bien las proteínas de 75 y 100 kDa representan las dianas antigénicas más relevantes [165, 166]. Se describió en 1977 por Wolf *et al.* en un grupo de pacientes con

polimiositis [167], posteriormente se denominó a este anticuerpo como anti-PM/Scl cuando en un grupo de pacientes con miopatía inflamatoria, la mitad de ellos presentaban signos clínicos de ES [168]. No son anticuerpos específicos del síndrome de solapamiento denominado escleromiositis, porque también se encuentran en pacientes con polimiositis o dermatomiositis aislada, en otras conectivopatías e incluso en pacientes con ES sin afección muscular [68, 168-177]. En la IFI se presenta como un patrón nucleolar homogéneo y moteado fino del nucleoplasma [166]. Como métodos de confirmación existen técnicas ELISA, ALBIA, inmunoblot en línea comercializados frente a las subunidades PM/Scl 75 y 100, aunque también se pueden determinar por inmunoprecipitación. En la ES se han relacionado con el subtipo ES limitada y con un riesgo aumentado de presentar EPI en aproximadamente 30 – 70% de los pacientes [68, 169-172, 177], sin embargo a pesar de esta alta frecuencia de EPI, no se ha estudiado el curso evolutivo y pronóstico de estos pacientes de forma específica. Igualmente parece relacionarse este anticuerpo a una mayor prevalencia de UD, y por el contrario, a una menor afección digestiva y menor frecuencia de HAP [177]. Recientemente se han asociado estos anticuerpos con un riesgo 3.9 veces mayor de neoplasia [178].

3.8. Anticuerpo anti-Ku

Se encuentra en el 1-3% de los pacientes. Los anticuerpos van dirigidos contra el antígeno Ku, que es una proteína kinasa dependiente de DNA (DNA-PK) y sus proteínas heterodímericas no histonas p70/p80 con capacidad de unión al DNA, que están relacionadas en la reparación del DNA, en la recombinación V(D)J, en la protección de los telómeros, en la replicación del DNA y en la regulación de los genes de transcripción [179, 180]. La IFI muestra un moteado fino nucleoplásico de las células en interfase, así como nucleolar. Como método de confirmación se utiliza el

inmunoblot en línea, aunque se puede emplear la inmunoprecipitación. No son específicos de la ES, ya que se presentan en la enfermedad de tejido conectivo indiferenciada, síndromes de solapamiento con hallazgos de lupus eritematoso sistémico, polimiositis, dermatomiositis, ES y síndrome de Sjögren, así como de forma aislada en pacientes con polimiositis/dermatomiositis, lupus eritematoso sistémico y ES. En los pacientes con ES, se ha asociado fuertemente a afección muscular y articular, pero con cierta protección frente a la vasculopatía digital [69].

3.9. Anticuerpo anti-U11/U12

Se asocia al 1.6-5% de los pacientes, estando dirigidos contra componentes de pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (RNPs_n) del espliceosoma, que cataliza el procesamiento del RNA pre-mensajero a RNA mensajero [181]. No existen técnicas comerciales para su identificación, únicamente se identifica por inmunoprecipitación. Los pacientes con este anticuerpo, prácticamente la mitad presentan el subtipo ES difusa, muestran alta prevalencia de afección gastrointestinal, EPI en el 79% de casos, pero sin ningún caso de HAP [143]. Estos pacientes se caracterizan por una EPI grave, con un riesgo aumentado de muerte o de requerir un trasplante pulmonar.

4. PRONÓSTICO

La mortalidad en la ES está incrementada, sin embargo existe un amplia variedad entre pacientes y entre diferentes poblaciones. En España, dentro del grupo RESCLE la supervivencia global a 10 años es del 83%, siendo del 94% en ES limitada, 98% en ES *sine* esclerodermia y del 86% para la ES difusa [182]. En la cohorte inglesa, Nihtyanova *et al.* describe una supervivencia a 10 años del 82% en los pacientes con ES limitada frente al 72% en los pacientes con ES difusa [121].

La supervivencia de la enfermedad ha aumentado en los últimos años, sobretodo en el caso de los pacientes con ES difusa, donde la supervivencia a 5 años en la cohorte inglesa ha aumentado del 69% en una serie de los años 1990-1993 hasta el 84% en una serie del 2000-2003 [183]. Estudios europeos en una cohorte italiana presentan datos similares con una mejora de la supervivencia a 10 años desde el 54% en pacientes del 1955-85 hasta el 83.5% en los pacientes reclutados entre 1999-2011 [184]. La mejoría en la supervivencia se debería a un mejor y más completo estudio de las complicaciones orgánicas de la ES, que posibilitan un abordaje terapéutico más temprano.

Al igual que la supervivencia ha mejorado en los últimos 40 años, las causas de muerte en la enfermedad también han cambiado [89]. De este modo en el período de 1972 a 2002, la supervivencia a 10 años ha mejorado francamente, desde el 54% en las cohortes de 1972-76 frente a las cohortes de 1987-91 del 66%, incluso excluyendo las muertes secundarias a crisis renal esclerodérmica. En el período de 1972-76, las causas de muerte más importantes fueron las relacionadas con la ES en un 70%, siendo las más prevalentes la crisis renal esclerodérmica, la HAP y la afección digestiva. Como consecuencia de un diagnóstico más temprano de la crisis renal esclerodérmica y la introducción para su tratamiento desde inicios de los años 80 de los inhibidores de la

enzima convertidora de angiotensina, descendió la mortalidad relacionada a la ES por esta causa específica del 42% al 6%. De este modo, en el último período analizado las muertes relacionadas con la ES suponían sólo el 50%, cobrando más protagonismo la fibrosis pulmonar hasta el 33% de las mismas y la HAP casi en el 30%, seguida de la afección digestiva. Como conclusión, las causas pulmonares suponen en el momento actual el 60% de las causas relacionadas con la enfermedad.

En estudios más recientes realizados en la cohorte del grupo EUSTAR con 5860 pacientes, el 55% de los fallecimientos se relacionan con la ES [185]. En este caso la EPI es responsable del 19% de todas las muertes registradas, seguida por la HAP en el 14% y las causas cardíacas en otro 14%. En el estudio multivariante, los factores relacionados con mayor riesgo de muerte fueron la presencia de proteinuria positiva, el diagnóstico de HAP, un patrón restrictivo respiratorio con FVC <80%, la presencia de disnea clase funcional III o IV, una mayor edad al inicio del fenómeno de Raynaud, una menor DLCO y un mayor mRSS.

Según los datos publicados más recientemente por la cohorte española del grupo RESCLE, la supervivencia global a 10 años es del 83%, estando el 55% de los fallecimientos relacionados con la ES [182]. La HAP es la causa más importante de muertes relacionadas con la enfermedad en un 16.6% respecto al total, siendo la EPI la segunda causa de muerte en un 13.0% de casos y la HP relacionada con la EPI en un 12.3%. En este estudio se determinaron como factores de riesgo independientes a una mayor mortalidad la presencia de crisis renal esclerodérmica (HR: 6.44), la EPI (HR: 3.18), el subtipo ES difusa (HR: 2.7), la HP (HR: 2.69) y una mayor edad al diagnóstico (HR: 1.11).

Dichos resultados, se corroboran en un reciente meta-análisis [186]. Dado que el modo más preciso de evaluar la mortalidad en una enfermedad se realiza mediante el cálculo de la razón de mortalidad estandarizada (RME), en la que se compara la mortalidad observada en dicha población de estudio frente a la mortalidad esperada en la población general de la misma área geográfica para la misma edad y sexo. Según los datos de 9239 pacientes con ES, la RME global es de 2.72, observando una mejoría entre los estudios previos a 1990 con una RME global de 3.35 frente al 2.42 de estudios posteriores a esta fecha. Teniendo en cuenta los subtipos cutáneos, los pacientes con ES difusa presentan una RME de 4.73 y en los enfermos con ES limitada la RME es de 2.04. Analizando por sexos, el sexo masculino presenta una RME de 3.14, siendo en el sexo femenino de 2.93. Como factores de riesgo más importante relacionados con una mayor mortalidad se confirman la EPI (HR: 2.89), la HP (HR: 2.62), el subtipo ES difusa (HR: 2.28), una mayor edad (HR: 1.05), la afección renal (HR: 4.22), la afección cardíaca (HR: 3.43), el sexo masculino (HR: 1.88) y una velocidad de eritrosedimentación elevada (HR: 2.77). De nuevo, el 47.6% de los fallecimientos se relacionan con la ES, suponiendo dentro de éstas la afección pulmonar la causa más prevalente, responsable del 47.8% de las muertes.

Como consecuencia de la mejoría en la supervivencia por afecciones secundarias a la enfermedad, las causas de muerte no relacionadas a la ES que cobran protagonismo en estudios desde el año 2000-09 son el cáncer (16%), las infecciones (5.3%), la insuficiencia renal crónica (2.7%), la enfermedad cerebrovascular (1.3%) y el embolismo pulmonar (1.3%) [91]. Esto sugiere que conforme mejora el tratamiento de las afecciones propias de la enfermedad, es necesario optimizar el tratamiento de otras comorbilidades similares a las que afectan a la población general e incluso investigar

Pronóstico

tratamientos que minimicen el impacto negativo o la toxicidad que puedan ser relevantes en el incremento de la mortalidad a priori no relacionada con la ES.

5. TRATAMIENTO

Para realizar un abordaje terapéutico adecuado, es esencial realizar una valoración inicial exhaustiva identificando el subtipo cutáneo e inmunológico, valorando el estadio de la enfermedad y determinando las complicaciones de la ES. En el seguimiento siempre se debe reevaluar de manera periódica las afecciones basales encontradas y la detección de nuevas. De forma basal es recomendable realizar una analítica general completa (que incluya la determinación del perfil de anticuerpos, función renal, serologías de infecciones), manometría esofágica, PFR, TACAR, ecocardiografía Doppler, electrocardiograma, radiografías de articulaciones y partes blandas y una capilaroscopia. Durante el seguimiento será necesario realizar analítica general, PFR y ecocardiografía Doppler al menos anualmente, si bien será obligatorio practicar dichas pruebas más frecuentemente si hubiera alguna de las afecciones viscerales relacionadas con la ES en el momento del diagnóstico.

Debido a las múltiples afecciones de la enfermedad, es importante valorar y categorizar cada una de las posibles alteraciones de forma diferencial, permitiendo el empleo de tratamientos dirigidos a las manifestaciones más importantes en cada paciente concreto, sin olvidar los aspectos emocionales y psicosociales que envuelven al enfermo. Del mismo modo, es clave contar con equipos de tratamiento multidisciplinares, que incluyan tanto médicos expertos en dicha enfermedad, cirujanos especializados en el tratamiento de las complicaciones osteoarticulares, como equipos de enfermería implicados en la cura de úlceras y en la educación sanitaria.

Aunque no exista hasta la fecha un tratamiento curativo de la enfermedad, se han aprobado diversos tratamientos dirigidos a cada una de las afecciones orgánicas presentes. En la tabla 9 se presentan las recomendaciones del grupo EULAR publicadas

en el 2016, para el tratamiento de la ES, de acuerdo a los órganos afectados, el nivel de evidencia y el grado de recomendación [187]. Debido a que dichas recomendaciones se basan en la revisión de la literatura hasta septiembre 2014, se describen a continuación los principales estudios que no se mencionan.

Tabla 9. Recomendaciones del grupo EULAR 2016 para el tratamiento de la ES

Recomendación	NE	GR
I. Fenómeno de Raynaud-ES		
- Antagonistas de canales de calcio dihidropiridínicos, normalmente nifedipino, deben ser considerados como primera línea. Inhibidores de PDE-5 deben considerarse en el tratamiento del FR-ES	1A	A
- Iloprost intravenoso debe ser considerado para FR-ES grave. Expertos recomiendan que el iloprost intravenoso debe usarse para el tratamiento de los ataques de FR-ES después del tratamiento oral.	1A	A
- La fluoxetina podría estar considerada en el tratamiento de los ataques de FR-ES	3	C
II. Úlceras digitales en pacientes con ES		
- Iloprost intravenoso debe ser considerado en el tratamiento de las UD en pacientes con ES.	1B	A
- Los inhibidores de PDE-5 deben ser considerados en el tratamiento de las UD en pacientes con ES.	1A	A
- Bosentan debe ser considerado para reducir el número de nuevas UD en ES, especialmente en pacientes con múltiples UD a pesar de calcioantagonistas, inhibidores de PDE-5 o tratamiento con iloprost.	1B	A
III. HAP-ES		
- AREs, inhibidores de PDE-5 o riociguat deben ser considerados para tratar la HAP-ES.	1B	B
- Epoprostenol intravenoso debe ser considerado para el tratamiento de pacientes con HAP-ES grave (clase III y IV).	1B	A
- Análogos a prostaciclina deben ser considerados para el tratamiento de pacientes con HAP-ES.	1B	B

IV. Piel y enfermedad pulmonar intersticial

<ul style="list-style-type: none"> - Metotrexato podría estar considerado para el tratamiento de las manifestaciones de la piel en fases iniciales de la ES difusa. - En vista de los resultados de dos ensayos clínicos randomizados de alta calidad y a pesar de su conocida toxicidad, la ciclofosfamida debe estar considerada para el tratamiento de la EPI-ES, en particular para pacientes con ES con EPI progresiva. - El trasplante de células madre hematopoyético debe estar considerado para el tratamiento de pacientes seleccionados con ES rápidamente progresiva con riesgo de fallo orgánico. En vista del alto riesgo de efectos adversos relacionados con el tratamiento y con la mortalidad temprana relacionada con el tratamiento, son de vital importancia una selección cuidadosa de los pacientes y la experiencia del equipo médico. 	1B	A
	1B	A
	1B	A

V. Crisis renal esclerodérmica

<ul style="list-style-type: none"> - Los expertos recomiendan el uso inmediato de IECA en el tratamiento de la crisis renal esclerodérmica. - La presión arterial y la función renal debe ser cuidadosamente monitorizada en los pacientes con ES en tratamiento con corticoides. 	3	C
	3	C

VI. Enfermedad gastrointestinal relacionada con ES

<ul style="list-style-type: none"> - Los IBPs deben ser usados para el tratamiento del reflujo gastroesofágico relacionado con la ES y prevención de úlceras esofágicas y estenosis. - Los procinéticos deben ser usados para el tratamiento de las alteraciones de motilidad sintomáticas relacionadas con la ES (disfagia, reflujo gastroesofágico, saciedad precoz, hinchazón, pseudoobstrucción, etc.). - Antibióticos intermitentes o de forma rotatoria deben ser considerados para tratar el sobrecrecimiento bacteriano sintomático en pacientes con ES. 	1A	C
	3	C
	3	D

ARE: antagonista del receptor de endotelina; EPI: enfermedad pulmonar intersticial; ES: esclerodermia sistémica; FR: fenómeno de Raynaud; GR: Grado de recomendación; HAP: hipertensión arterial pulmonar; IBP: inhibidor de la bomba de protones; IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; NE: Nivel de evidencia; PDE-5: fosfodiesterasa 5; UD: úlceras digitales;

En el tratamiento de la EPI se ha publicado el ensayo SLS II, que evalúa los resultados a 2 años comparando el tratamiento con dosis altas de micofenolato mofetilo durante 2 años frente al tratamiento con ciclofosfamida oral durante un año y posterior observación [188]. Se demuestra que la FVC aumentaba desde la visita basal en un 2.19% en el grupo de micofenolato y un 2.88% en el grupo de ciclofosfamida oral. Aunque no se objetivan diferencias entre ambos grupos de pacientes, se documenta una mayor tolerabilidad y menor toxicidad a favor del grupo tratado con micofenolato. Según estos resultados, se sugiere iniciar el micofenolato a dosis altas en los pacientes con EPI-ES, debido a su mejor perfil de seguridad.

En el tratamiento de la HAP, se ha aprobado el selexipag, un agonista selectivo del receptor IP de prostaciclina [189]. El ensayo clínico GRIPHON realizado en 1156 pacientes con HAP, dentro de los cuales había un 28.9% con HAP asociada a alguna conectivopatía, demostró la eficacia del selexipag durante una duración media de 74 semanas, reduciendo el riesgo de morbi-mortalidad respecto al grupo placebo. La variable combinada objetivo incluía la muerte por todas las causas, hospitalización por empeoramiento de la HAP, empeoramiento de la HAP que requiriese trasplante pulmonar o septostomía auricular, el inicio de prostanoides parenterales o el uso de oxigenoterapia crónica por empeoramiento de la HAP y progresión de la enfermedad. Del mismo modo, han sido publicados los resultados de estudios para el tratamiento combinado en la HAP, usando dos o más clases terapéuticas de forma simultánea. El estudio COMPASS-2, donde el 26% de pacientes con HAP presentaban alguna conectivopatía, que valoraba añadir bosentan al tratamiento con sildenafil, no demostró una reducción significativa en el tiempo al empeoramiento clínico, pero sí una mejora en el tiempo de caminar en 6 minutos o las cifras de NT-proBNP [190]. El ensayo

AMBITION ha demostrado recientemente la eficacia de la combinación inicial del ambrisentan y tadalafilo frente al tratamiento con ambrisentan o tadalafilo en monoterapia, aumentando el tiempo al empeoramiento clínico [191]. Utilizando también un objetivo primario combinado que incluye muerte por cualquier causa, hospitalización por empeoramiento de HAP, progresión de la enfermedad o respuesta clínica no satisfactoria a largo plazo.

6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La ES es una enfermedad rara, poco prevalente, pero con gran impacto en la calidad de vida y en la supervivencia de los pacientes debido a la variedad de sus manifestaciones orgánicas y el mal pronóstico de las mismas. Afecta principalmente al sexo femenino, y la edad de presentación más frecuente es en la cuarta década de la vida, por lo que mortalidad es muy superior respecto a la población sana de su misma edad.

Debido a la implementación del uso de los IECAs en el tratamiento de la crisis renal esclerodérmica, la afección pulmonar asociada a la ES se ha convertido desde finales de la década de los 80 en la primera causa de muerte relacionada con la enfermedad. Es por tanto, de vital importancia estudiar tanto factores asociados al pronóstico de las afecciones respiratorias así como poder diagnosticar precozmente las mismas, para realizar un tratamiento más adecuado y/o agresivo a la vez de temprano, para poder modificar el curso natural de la enfermedad.

En el caso de la EPI, está ampliamente descrito que los pacientes con anticuerpos anti-Scl-70 presentan un curso evolutivo de la fibrosis más agresivo, con un deterioro rápido de la capacidad respiratoria pulmonar y un temprano desarrollo de enfermedad pulmonar restrictiva grave, con una supervivencia reducida. Sin embargo, no se ha estudiado específicamente la evolución de las pruebas funcionales de los pacientes con EPI asociada a ES que presentan anticuerpos anti-PM/Scl.

Paralelamente, aunque se ha estudiado de forma trasversal los niveles de biomarcadores no invasivos en el CAE y en AE en los pacientes con EPI, el papel

pronóstico de los mismos ha sido escasamente valorado. Por este motivo los estudios a largo plazo del curso clínico de estos pacientes son necesarios.

En cuanto a la HAP, se ha comprobado la importancia de los métodos de cribaje en el aumento de la supervivencia debido a la instauración temprana del tratamiento vasodilatador específico. Recientemente se ha publicado un nuevo algoritmo de diagnóstico precoz específico para los pacientes con ES, sin embargo, requiere de la validación en cohortes externas. Los pacientes con ES que presentan valores de HP limítrofe se encuentran en un alto riesgo de desarrollar HAP establecida y una mayor mortalidad. Así mismo, los pacientes con HP relacionada con la EPI o por cardiopatía izquierda también presentan un peor pronóstico. De este modo, es importante investigar la capacidad de dicho algoritmo en el diagnóstico temprano de la HP limítrofe y en otros tipos de HP.

7. OBJETIVOS

- 1.- Establecer el curso clínico de la EPI asociada a la ES en los pacientes con anticuerpos anti-PM/Scl comparado con un grupo de pacientes con anticuerpos anti-Scl-70, valorando la evolución de las PFR como medida objetiva indicadora del deterioro pulmonar.
- 2.- Analizar biomarcadores en el AE y CAE en pacientes con EPI asociada a ES y estudiar su asociación con las PFR basales comparándolo con pacientes con ES sin EPI.
- 3.- Determinar si los biomarcadores se correlacionan con la progresión de la EPI para valorar su potencial significación pronóstica.
- 4.- Validar el algoritmo DETECT de detección precoz de HAP en una cohorte externa a la del estudio original.
- 5.- Comprobar la capacidad del algoritmo DETECT en detectar precozmente la HP limítrofe o la HAP establecida.
- 6.- Valorar la capacidad del algoritmo DETECT en detectar de forma precoz cualquier tipo de HP.

8. PUBLICACIONES



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Arthritis and Rheumatism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semarthrit

Good outcome of interstitial lung disease in patients with scleroderma associated to anti-PM/Scl antibody



Alfredo Guillen-Del Castillo, MD^{a,*}, Carmen Pilar Simeón-Aznar, MD, PhD^a, Vicent Fonollosa-Pla, MD, PhD^a, Serafín Alonso-Vila, MD^a, María M. Reverte-Vinaixa, MD^b, Xavier Muñoz, MD, PhD^c, Esther Pallisa, MD^d, Albert Selva-O'Callaghan, MD, PhD^a, Andreu Fernández-Codina, MD^a, Miquel Vilardell-Tarrés, MD, PhD^a

^a Department of Systemic Autoimmune Diseases, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

^b Department of Trauma and Orthopaedic Surgery, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Department of Pneumology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^d Department of Radiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Keywords:
Systemic sclerosis
Interstitial lung disease
Pulmonary fibrosis
Anti-PM/Scl antibodies
Anti-topoisomerase I antibodies
Pulmonary function test
Prognosis

Objective: The objective of this article was to establish the clinical course of interstitial lung disease (ILD) in scleroderma related to the presence of anti-PM/Scl antibody compared with anti-Scl-70 in a Spanish cohort. Furthermore, no study has thoroughly investigated the outcome of pulmonary function test in the first group of patients.

Methods: A total of 63 Spanish patients with scleroderma and ILD were selected in a retrospective observational study. Among them, 14 were positive for anti-PM/Scl antibodies and 49 for anti-Scl-70. Clinical assessments, including pulmonary function test, were collected. Variations equal or greater than 10% in forced vital capacity (FVC) were considered significant. Progression-free survival of disease was defined as the period of stable illness since pulmonary fibrosis diagnosis.

Results: Anti-Scl-70 patients had a higher frequency of diffuse SSc subset, peripheral vasculopathy, and gastrointestinal involvement. Inflammatory myopathy was associated to anti-PM/Scl antibody. Anti-PM/Scl patients presented more improvement in FVC during follow-up, 30.8% compared to a 7.1% in Scl-70 group ($P = 0.04$), with less worsening of this parameter (15.4% vs 52.4% in Scl-70 patients, $P = 0.01$), and secondary less frequency of severe restrictive pattern ($FVC < 50\%$) (7.7% compared to 42.9% in the other group, $P = 0.02$). Regarding treatment, more calcineurin inhibitors were used in anti-PM/Scl patients, while cyclophosphamide and mycophenolate were mainly used in anti-Scl-70 patients. The progression-free survival of disease was higher in anti-PM/Scl patients, with 76% at 10 years from diagnosis of ILD against a 29% in the Scl-70 group.

Conclusions: Several features and prognosis of ILD in SSc may be modified depending on the identified immunological profile.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a multisystemic autoimmune disease, which has a wide clinical individual variability, causing substantial differences in the severity of skin and internal organ affection. Interstitial lung disease (ILD) is the most characteristic example of

an organ fibrosis in this entity. The ILD is more severe and early in diffuse cutaneous subset (dcSSc), but patients with limited cutaneous systemic sclerosis (lcSSc) can evolve to it too [1]. Probably the ILD development and its severity are related to specific autoantibodies. The anti-topoisomerase I (anti-Scl-70) antibody's relation with ILD in scleroderma has been well documented [2–4]. Steen [5] proposed to consider scleroderma as seven or more distinct diseases because features of patients with lcSSc and with dcSSc differed depending on associated autoantibodies. In that article, anti-Scl-70 and PM/Scl antibodies were related to ILD, but there were important differences in the prognosis measured following the SSc diagnosis. Nevertheless, it was not possible to

Source of support: This study was supported by Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2014).

* Corresponding author.

E-mail address: aguille@vhebron.net (A. Guillen-Del Castillo).

compare both groups directly, as the disease duration at the time of diagnosis was different, so the analysis was made following the classification regarding the cutaneous subset.

In 1977, Wolfe et al. [6] described for the first time a group of patients with polymyositis and an antibody precipitated by immunodiffusion. Later, Reichlin et al. [7] defined that antibody as anti-PM/Scl when in a group of patients with inflammatory myopathy half of them had features of scleroderma. The PM/Scl autoantibodies are mainly found in the scleromyositis overlap, although they are also present in polymyositis, dermatomyositis, other connective tissue diseases (CTD), and even SSc without features of myopathy involvement [5,7–16]. Since anti-PM/Scl was described, only a few studies have been focused on patients with SSc, in which the prevalence of ILD was between 30% and 78% [5,8–11,16].

This article attempts to establish the clinical course of ILD in scleroderma related to the positivity against anti-PM/Scl antibody comparing with another well-characterized group with anti-Scl-70 antibody, with emphasis on the outcome of pulmonary function test (PFT) as an objective measure to indicate lung impairment. To our knowledge, this is the first time that the lung outcome is specifically analyzed in patients with ILD related with SSc and anti-PM/Scl antibodies.

Methods

Patients

A total of 159 patients with diagnosis of scleroderma and ILD were registered in the retrospective cohort from Vall d'Hebron Hospital, from April 1980 to December 2012. All of them fulfilled the LeRoy and the ACR/EULAR 2013 classification criteria [17,18]. Of them, 63 patients were selected for positivity against either anti-Scl-70 or anti-PM/Scl antibodies, another two patients were excluded for positivity to both antibodies. Among them, 49 had anti-Scl-70 antibodies and 14 had anti-PM/Scl antibodies. The ILD diagnosis was established by the existence of interstitial fibrosis on the high-resolution computed tomography (HRCT). Based on the extension of skin involvement, patients were divided into dcSSc or lcSSc. The disease onset was defined as the date of first symptom attributable to SSc, including Raynaud's phenomenon (RP) as previously reported [19–25]. This study was conducted after the approval of the Ethics Committee of the Vall d'Hebron Hospital.

Organ assessment

Peripheral vasculopathy was defined as history of RP or digital ulcers (DU). The prevalence of calcinosis was collected. Joint involvement was described as arthritis or tendon friction rubs. Skeletal muscle involvement was defined as non-inflammatory myopathy if documented weakness on physical examination and none or mild elevation of serum levels of creatine kinase (CK) enzyme with normal electromyogram (EMG) and/or muscle biopsy were present. Inflammatory myopathy or myositis was defined as muscle weakness and elevation of CK levels and a myopathic pattern in the EMG or signs of myositis in the muscle biopsy. Gastrointestinal involvement was diagnosed as the following: esophageal involvement when hypomotility was documented by manometry, cine-radiographic, or isotopic study; gastric involvement when gastric hypomotility was confirmed by radiographic, radionuclide study, or when gastric antral vascular ectasia was documented by upper-endoscopy; or intestinal involvement when either a motility alteration by cine-radiographic study or manometry was confirmed, when malabsorption was established by breath test, or when intestinal pseudo-obstruction with

radiographic abnormalities was identified. Cardiac involvement was characterized by any of the following: pericarditis; heart failure; ischemic cardiopathy of unknown cause by radionuclide study (reversible thallium perfusion defects after cold stimulation); pericardial effusion, restrictive miocardiopathy, left ventricular ejection fraction lower than 50%, or any valvulopathy dysfunction other than tricuspid regurgitation by echocardiography; or electrocardiographic alterations without another cause. Pulmonary hypertension (PH) was diagnosed as a right ventricular systolic pressure (RVSP) estimated to be above 40 mmHg by Doppler-echocardiogram or when mean pulmonary arterial pressure (mPAP) measured in right heart catheterization was equal or higher than 25 mmHg. Scleroderma renal crisis (SRC) was defined as severe arterial hypertension and/or rapidly progressive renal failure [26].

High-resolution computer tomography (HRCT)

The HRCT records were reviewed by an experienced pulmonary radiologist (E.P.), blinded to clinical and antibody status. ILD was defined as presence of ground glass opacities or reticular or honeycombing pattern. The extension of disease was calculated as the mean of nearest 5% in each of the five sections (origin of great vessels, main carina, pulmonary venous confluence, halfway between the third and fifth section, and immediately above the right hemi-diaphragm) and extensive disease was diagnosed following the published algorithm [27].

Pulmonary function test

PFTs were performed by MasterLab equipment (Jaeger Healthcare, Hoechberg, Germany) following the recommendations of the American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS) [28,29]. The predicted values were calculated according to Mediterranean population [30]. Variables were expressed as the percentage expected, forced vital capacity (FVC), and diffusing capacity of carbon monoxide corrected by the alveolar volume (KCO). PFTs were collected at baseline and during follow-up. With both baseline and the last PFTs, another variable, difference of PFTs raw and adjusted by the time of follow-up, was determined. The significant variations on the PFTs were considered by ATS recommendations for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Improvement was defined as an increase equal or higher than 10% in the FVC; worsening was established as a decrease equal or higher than 10% in the FVC. Stabilization was considered when the measurements were between both extremes [31]. Progression-free survival (PFS) of disease following IPF trial studies was defined as the time-period of stable ILD until the point at which a decrease from baseline FVC of at least 10% or death occurs during follow-up [32,33]. Severe restrictive disease-free survival was defined as the time until developing a FVC less than 50% or death.

Nailfold Capillaroscopy

Nailfold capillaroscopy was evaluated using a Wild M3 stereomicroscope (Urdorf, Zurich, Switzerland). Early, active, and late patterns were defined as have been described [34].

Immunological test

Antinuclear antibodies (ANA) were determined by indirect immunofluorescence assay using HEp-cell line 2. PM/Scl antibodies were measured by commercial line blot assay (Myositis Profile Euroline, Euroimmun, Germany), and anti-Scl-70 antibodies were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay [35].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL). Data analysis included descriptive statistics to describe the results of our retrospective series. To assess whether there were statistically significant differences between the two groups, non-parametric tests were used. Quantitative variables were analyzed by the Mann-Whitney *U* test; categorical variables were used in a contingency table test by the chi-square and the Fisher's exact tests. The Kaplan-Meier method was required to estimate survival, and the log-rank test was used to analyze differences in survival between both antibodies. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Baseline features

To assess the differences in clinical features between both groups of patients with ILD, we studied 63 patients with scleroderma and ILD with positivity either for anti-Scl-70 or anti-PM/Scl antibodies. There were 54 women and nine men (F:M ratio = 6:1). Median age (interquartile range, IQR) at disease onset was 43.0 (33.0–54.0) years (Table 1). The RP was the most frequent first symptom presented in the 71.4% of patients. Nevertheless, if we considered the non-RP symptoms, arthritis and puffy hands were the first symptoms in 57.1% of patients from the anti-PM/Scl group ($P < 0.001$), whereas for the anti-Scl-70 patients it happened to be thickening of skin in the 55.1% ($P < 0.001$).

Diffuse subset was more common in the Scl-70 group ($n = 34$, 69.4%) than in the anti-PM/Scl group ($n = 1$, 7.1%) ($P < 0.001$), whereas limited cutaneous scleroderma was present in 15 and 13 patients, respectively. The median (IQR) age at ILD diagnosis was 51.5 (39.5–63.0) years in anti-PM/Scl patients, being similar to 54.0 (41.5–59.5) years in anti-Scl-70 patients. From the first non-RP symptom of SSc to the ILD diagnosis, there was a tendency to be shorter in Scl-70 group with a median (IQR) of 2.0 (0.0–7.0) years, while there was 2.0 (0.0–10.5) years in the other group with no statistical differences.

The diagnostic HRCT had no differences between both groups. The extension of interstitial pattern higher than 20% or extensive disease was found in 65.6% of the whole cohort, with a peripheral basilar pattern in 96.7%. The basal PFTs showed a moderate restrictive pattern with a median (IQR) FVC of 73.6% (55.0–90.0).

Concerning the capillaroscopy features, the active pattern was present in 23.5% of the patients.

Organ involvements

Regarding the organ affections, peripheral vasculopathy was less frequent in the anti-PM/Scl group ($n = 11$, 78.6%) presented as RP ($n = 11$, 78.6%) or DU ($n = 4$, 28.6%) (Table 2), as well as less gastrointestinal involvement ($n = 8$, 57.1%) and esophageal dysfunction ($n = 5$, 35.7%). However, there were no statistical differences in prevalence of calcinosis or joint involvement. Otherwise, the myositis was more frequent in the anti-PM/Scl group ($n = 10$, 71.4%) than in the anti-Scl-70 one ($n = 3$, 6.1%) ($P < 0.001$). Furthermore, cardiac involvement was similar in both groups of antibodies, despite the fact that anti-Scl-70 tended to have a slight more prevalence in heart failure ($n = 13$, 26.5%). SRC was diagnosed in four patients (8.2%) from the anti-Scl-70 group, although there were no differences compared to the anti-PM/Scl group (0%) ($P = 0.56$).

Lung outcome

Any grade of dyspnea was less commonly presented in anti-PM/Scl patients ($n = 7$, 50% vs $n = 36$, 73.4% in anti-Scl-70 group, $P = 0.03$) (Table 3). PH was similar when comparing both groups, being present in 19 patients (30.1%) of the global cohort. According to the course of the PFT, the time of follow-up since the ILD diagnosis was similar, with a median (IQR) of 5.8 (2.8–11) years for the anti-PM/Scl group and 7.1 (3.7–9.1) years for the anti-Scl-70 ($P = 0.86$). An increment from the baseline FVC predicted was documented in anti-PM/Scl patients: the median (IQR) of the difference was 1.1% (−9.1 to 13.4), while in the anti-Scl-70 group, it decreased, 10.9% (−24.5 to −2.3) ($P = 0.004$). There were no statistical differences in the evolution of KCO between both groups, although the median (IQR) of diminution was slightly higher in anti-PM/Scl patients, 14.6% (−31.3 to −4.6), vs 7.5% (−25.0 to −0.2) in the other group ($P = 0.36$). The data for the diffusion parameters could not be collected during follow-up in 11 patients from anti-Scl-70 group because the forced expiratory volume in 1 s (FEV1) was less than 1 L. Diffusion parameters data were missing in 15 patients from anti-Scl-70 group and in 5 PM/Scl patients. When data analysis was adjusted by the time of follow-up, the anti-PM/Scl group had an increment of FVC predicted per year of follow-up of 0.1%/year (−1.6 to 1.9), compared with a decrease of 1.7%/ P value

Table 1
Baseline features

	Global ($n = 63$)	Anti-Scl-70 ($n = 49$)	Anti-PM/Scl ($n = 14$)	P value
Age at first symptom, median (IQR), years	43.0 (33.0–54.0)	41.0 (32.5–53.5)	47.0 (38.0–56.2)	0.39
Age at first non-RP symptom, median (IQR), years	48.0 (39.0–56.0)	48.0 (38.0–56.0)	48.5 (38.0–56.2)	0.92
RP as first symptom, n (%)	45 (71.4)	37 (75.5)	8 (57.1)	0.06
Non-RP as first symptom, n (%)				
Arthritis or puffy hands	13 (20.6)	5 (10.2)	8 (57.1)	< 0.001
Thickening of skin	27 (42.8)	27 (55.1)	0 (0)	< 0.001
dcSSc/lcSSc, n (%)	35/28 (55.6/44.4)	34/15 (69.4/30.6)	1/13 (7.1/92.9)	< 0.001
Age at ILD diagnosis, median (IQR), years	54.0 (42.0–60.0)	54.0 (41.5–59.5)	51.5 (39.5–63.0)	0.96
Diagnostic HRCT features, n (%)				
Extensive disease	40/61 (65.6)	32/47 (68.1)	8/14 (57.1)	0.52
Peripheral-basilar	59/61 (96.7)	46/47 (97.3)	13/14 (92.9)	0.40
Baseline PFTs, median (IQR), years				
FVC, % predicted	73.6 (55.0–90.0)	72.0 (54.0–91.0)	75.7 (58.5–81.6)	0.89
KCO, % predicted	73.2 (61.6–91.0)	69.5 (59.5–83.0)	91.0 (79.7–94.2)	0.06
Active nail-fold capillaroscopy pattern, n (%)	12/51 (23.5)	7/37 (18.9)	5/14 (35.7)	0.34

IQR: interquartile range; RP: Raynaud's phenomenon; dcSSc: diffuse cutaneous systemic sclerosis; dcSSc: limited cutaneous systemic sclerosis; ILD: interstitial lung disease; HRCT: high-resolution computed tomography; PFTs pulmonary function test; FVC: forced vital capacity; KCO: diffusing capacity of carbon monoxide corrected by the alveolar volume.

Table 2
Organ involvements

	Global (n = 63)	Anti-Scl-70 (n = 49)	Anti-PM/Scl (n = 14)	P value
Peripheral vasculopathy, n (%)	60 (95.2)	49 (100)	11 (78.6)	0.009
Raynaud's phenomenon	59 (93.7)	48 (98.0)	11 (78.6)	0.03
Digital ulcers	38 (60.3)	34 (69.4)	4 (28.6)	0.006
Gastrointestinal, n (%)	56 (88.9)	48 (98.0)	8 (57.1)	< 0.001
Esophageal dysfunction	36 (57.1)	31 (63.3)	5 (35.7)	0.005
Calcinosis, n (%)	12 (19.0)	9 (18.4)	3 (21.4)	1.0
Joint involvement, n (%)	32 (50.8)	23 (46.9)	9 (64.3)	0.25
Skeletal muscle involvement, n (%)	21 (33.3)	11 (22.4)	10 (71.4)	0.001
Non-inflammatory myopathy	8 (12.7)	8 (16.3)	0 (0)	0.18
Inflammatory myopathy	13 (20.6)	3 (6.1)	10 (71.4)	< 0.001
Cardiac involvement, n (%)	51 (81.0)	42 (85.7)	9 (64.3)	0.11
Heart failure	13 (20.6)	13 (26.5)	0 (0.0)	0.05
Scleroderma renal crisis, n (%)	4 (6.3)	4 (8.2)	0 (0.0)	0.56

year (−4.7 to −0.2) in anti-Scl-70 patients. There were no statistical differences in the course of KCO adjusted per year during follow-up.

According to the ATS/ERS criteria to assess a significant variation in the clinical course of lung fibrosis (unless $\geq 10\%$ variation in FVC) [31], the anti-PM/Scl group had a lower percentage of significant worsening of FVC in 15.4% (two out of 13) vs 52.4% (22 out of 42) in the anti-Scl-70 group ($P = 0.01$) and a higher proportion of significant improvement of FVC in 30.8% (four out of 13) vs 7.1% (three out of 42) in the anti-Scl-70 group ($P = 0.04$). According to this data, a lower proportion of severe restrictive pattern (FVC < 50%) was documented during follow-up in anti-PM/Scl patients, 7.7% (one out of 13) compared with 42.9% (18 out of 42) in the other group ($P = 0.02$). In fact, four patients within the anti-Scl-70 group required chronic oxygen therapy and another needed lung transplantation.

Table 4 shows the therapies that have been given in each group of autoantibodies before or after the ILD diagnosis. There were no differences in corticosteroids therapy, while there was less

frequency of treatment of cyclophosphamide and mycophenolate in the anti-PM/Scl group (7.1% for both compared with 42.8% and 40.8%, respectively, in anti-Scl-70 patients, $P = 0.02$). However, a higher use of calcineurin inhibitor therapy in 57.1% of anti-PM/Scl patients was documented, compared with 2.0% in anti-Scl-70 patients ($P < 0.001$).

Survival

Of all patients, 21 died during the follow-up, three of non-related SSc causes (two of breast cancer and another one of hemorrhagic stroke). Three patients died of potential complications related to the immunosuppressive therapy (one from sepsis and two others from leukemia). Although only one patient in the anti-PM/Scl group died from SSc-related issues (from ILD) compared with 14 patients in the anti-Scl-70 group (five from ILD, four from ILD and PH, four from SRC, and one from pulmonary arterial hypertension), there were no statistical differences between the survival between both cohorts (Log-rank test, $P = 0.19$) (data not shown). However, the progression-free survival (PFS) of disease was higher in the anti-PM/Scl patients with 76% at 10 years since diagnosis of ILD (95% CI: 0.52–0.99), whereas the other group presented only 29% (95% CI: 0.13–0.44) (log-rank test, $P = 0.04$) (Fig. 1). According to this data, Figure 2 represents severe restrictive disease-free survival, which was significantly greater in the anti-PM/Scl group with 92% since ILD diagnosis (95% CI: 0.76–0.99), while the anti-Scl-70 group had 31% (95% CI: 0.15–0.46) (log-rank test, $P = 0.008$).

Discussion

The current study is a retrospective analysis of ILD outcome related to SSc depending on its association to anti-PM/Scl or anti-Scl-70 antibodies. The anti-PM/Scl patients had a stabilization of FVC during follow-up. Even one-third of them had an improvement higher than 10% in FVC. This group presented better PFS and severe restrictive disease-free survival.

The age at first symptom of SSc was similar to other series in the literature [1,5,24,36]. Although the most frequent symptom of scleroderma's onset was RP in both groups, if we considered the first non-RP symptom, the presence of arthritis or puffy hands was the most frequent first symptom in the anti-PM/Scl group and the thickening of the skin in the other group. These data were partially described previously by Reimer et al. [37], who found a lower frequency of RP as a first onset symptom in eight anti-PM/Scl

Table 3
Lung outcome

	Global (n = 63)	Anti-Scl-70 (n = 49)	Anti-PM/Scl (n = 14)	P value
Dyspnea, n (%)	43 (68.2)	36 (73.4)	7 (50)	0.03
Pulmonary hypertension, n (%)	19 (30.1)	16 (32.7)	3 (21.4)	0.52
Follow-up ^a , median (IQR), years	7.0 (3.5–10.0)	7.1 (3.7–9.1)	5.8 (2.8–11.1)	0.86
Differences in PFTs, median (IQR)				
ΔFVC, % predicted	−7.2 (−16.0 to −0.1) (n = 55)	−10.9 (−24.5 to −2.3) (n = 42)	1.1 (−9.1 to 13.4) (n = 13)	0.004
ΔKCO, % predicted	−12.8 (−24.7 to −0.3) (n = 32)	−7.5 (−25.0 to −0.2) (n = 23)	−14.6 (−31.3 to −4.6) (n = 9)	0.36
Differences in PFTs/year median (IQR)				
ΔFVC, % predicted/year	−1.2 (−4.0 to −0.0) (n = 55)	−1.8 (−5.0 to −0.4) (n = 42)	0.1 (−1.6 to 1.9) (n = 13)	0.01
ΔKCO, % predicted/year	−1.6 (−3.7 to −0.3) (n = 32)	−1.2 (−3.7 to −0.3) (n = 23)	−1.8 (−3.8 to −0.1) (n = 9)	0.57
Worsening FVC ATS/ERS, n (%)	24/55 (43.6)	22/42 (52.4)	2/13 (15.4)	0.01
Improvement FVC ATS/ERS, n (%)	7/55 (12.7)	3/42 (7.1)	4/13 (30.8)	0.04
FVC < 50%, n (%)	19/55 (34.5)	18/42 (42.9)	1/13 (7.7)	0.02

n = Number of patients in whom those data were available. ILD: interstitial lung disease; ΔFVC: variation in forced vital capacity (last FVC minus baseline FVC); ΔKCO: variation in diffusing capacity of carbon monoxide corrected by the alveolar volume (last KCO minus baseline KCO); ATS/ERS: American Thoracic Society and European Respiratory Society recommendations.

^a Follow-up since ILD diagnosis.

Table 4
Regimens of treatment

	Global (n = 63)	Anti-Scl-70 (n = 49)	Anti-PM/Scl (n = 14)	P value
Prednisone < 10 mg/day (> 3 months)	37 (58.7)	28 (57.1)	9 (64.3)	0.63
Prednisone > 10 mg/day (> 3 months)	38 (60.3)	31 (63.3)	7 (50.0)	0.37
Cyclophosphamide	21 (33.3)	20 (40.8)	1 (7.1)	0.02
Mycophenolate	21 (33.3)	20 (40.8)	1 (7.1)	0.02
Azathioprine	18 (28.6)	14 (28.6)	4 (28.6)	1.0
Ciclosporin A or tacrolimus	8 (12.7)	1 (2.0)	7 (50.0)	< 0.001
Intravenous immunoglobulin	8 (12.7)	4 (8.2)	4 (28.6)	0.06
Rituximab	4 (6.3)	4 (8.2)	0 (0.0)	0.27
Oxygenotherapy	4 (6.3)	4 (8.2)	0 (0.0)	0.27

patients. Regarding the prevalence of dcSSc in patients with anti-Scl-70 antibody, it was similar to that reported by Steen et al. (71%) in the Spanish Registry of SSc (67.1%) or in the EULAR Registry (60%) [1,5,24]. This antibody has been associated with dcSSc and more aggressive outcome of ILD [3], and dcSSc subset has been correlated with worse clinical outcome of ILD [38]. LcSSc was the most common subset (92.9%) in the anti-PM/Scl group, only one patient presented dcSSc, which contrasts with the 22–43.7% previously reported [5,11,16]. That may be partially justified by the lower percentage of dcSSc in Europe, and specifically in the Caucasian population [39]. Peripheral vasculopathy and DU were less common in the anti-PM/Scl group (78.6% and 28.6%, respectively), being less than described by Koschik et al. [16], which may be related to the non-inclusion of the presence of abnormal capillaries in our definition of this affection. We also found a higher frequency of gastrointestinal disease in anti-Scl-70 patients. The inflammatory myopathy as part of an overlap between SSc and polymyositis/dermatomyositis was more frequent in anti-PM/Scl patients, affecting 71.4% of them, a similar proportion to the 50–88% already described [9,11,16]. PH had similar prevalence in both groups, but higher than the 2–5% observed in other series [5,16]. That could be explained because in our cohort we included hypertension due to pulmonary fibrosis and patients with RVSP more than 40 mmHg by echocardiography with no right heart catheterization (RHC) in all patients, which may have falsely increased the frequency of PH [1,40].

Concerning lung outcome, we identified a stabilization of ventilatory parameters in patients with ILD associated with the presence of anti-PM/Scl antibodies, which confirms previous published data [15]. Extensive disease in HRTC was present in more than half of patients in both groups. The age at diagnosis of ILD and time of follow-up after the ILD diagnosis were similar in both groups, similar to in other studies [41]. Significantly, patients with anti-PM/Scl antibody had less dyspnea and, according to the ATS/ERS guidelines, only 15.4% of them presented a significant worsening in the FVC in the follow-up, another 30.8% had a significant improvement of the FVC, and the remaining 53.8% stayed stable. However, a significant decrease of 51.4% was identified in the anti-Scl-70 group. Furthermore, the median of variation of FVC adjusted per year of follow-up had an increase of 0.1%/year in anti-PM/Scl patients, being significantly better than the decrease of 1.8%/year seen in the anti-Scl-70 group. This pulmonary deterioration was slightly better than 3%/year described by Steen [2] in a late phase of the disease, which could be justified by a long follow-up time and due to an underestimation for using the absolute decrease in FVC percentage. In contrast, there were no objectified differences in the variation of KCO because 11 patients from the anti-Scl-70 group had a FEV1

inferior to 1 L, necessary to perform an accurate diffusion CO test, and the other patients had missing data. That supposes a bias for the KCO assessment, as the more severe patients are excluded due to the methodological difficulties that make that technique unreliable for evaluating severe lung involvement. At the end of follow-up, a severe restrictive pattern (FVC < 50%) was found in 7.7% of patients with anti-PM/Scl-positive antibody, which contrasts with 27% of Pittsburgh's series [5].

The good outcome in anti-PM/Scl patients was comparable to that previously reported in a cohort of patients with CTD and ILD associated to anti-aminocycl-tRNA synthetase antibodies, with both good response to immunosuppressive therapy and prognosis [15]. In our group, myopathy may have affected to the initial PFTs, and a secondary good outcome of the muscle skeletal condition under treatment may misguidedly increase the FVC. However, not one of the patients with myositis (n = 13) had a respiratory insufficiency or needed assisted mechanical ventilation, and no elevation of the diaphragms were identified in the radiology test, which suggests that skeletal issue did not play a major role in the initial lung parameters. In the same way, the myositis was well controlled with immunosuppressive therapy, which means that it could not affect the lower frequency of severe restrictive pattern at the end of follow-up.

Regarding the regimens of treatment administered at any time of follow-up, anti-Scl-70 patients were more frequently treated with cyclophosphamide and mycophenolate, due to more aggressive approach of lung function deterioration. However, calcineurin inhibitors were commonly used in the anti-PM/Scl group due to myopathy involvement.

Koschik et al. recently published a study of 76 SSc patients with anti-PM/Scl antibodies compared with SSc patients without this antibody and showed that its presence had a protective effect with a cumulative survival of 91%, measuring the survival from the first physician diagnosis of SSc. In our cohort, differences in the global survival curves were not found, probably because our assessment was estimated from ILD diagnosis, which is more accurate to detect divergent outcomes due to this organ involvement. As a surrogate marker of global survival and quality of life, we performed the PFS and severe restrictive disease-free survival,

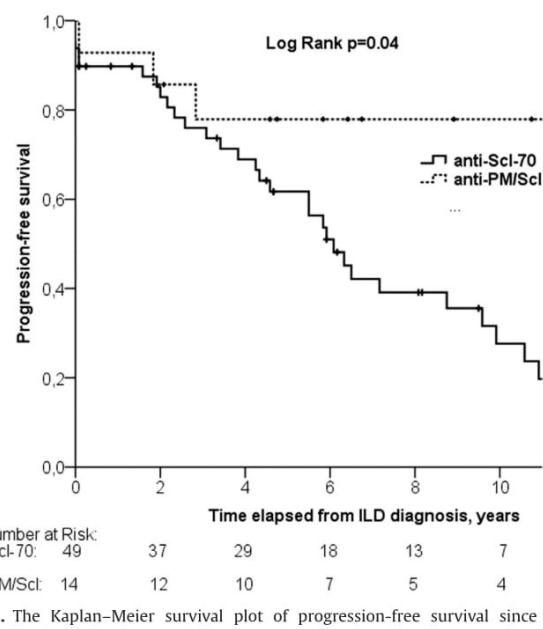


Fig. 1. The Kaplan-Meier survival plot of progression-free survival since ILD diagnosis. The end point was defined as a decrease from baseline FVC of at least 10% or death during follow-up.

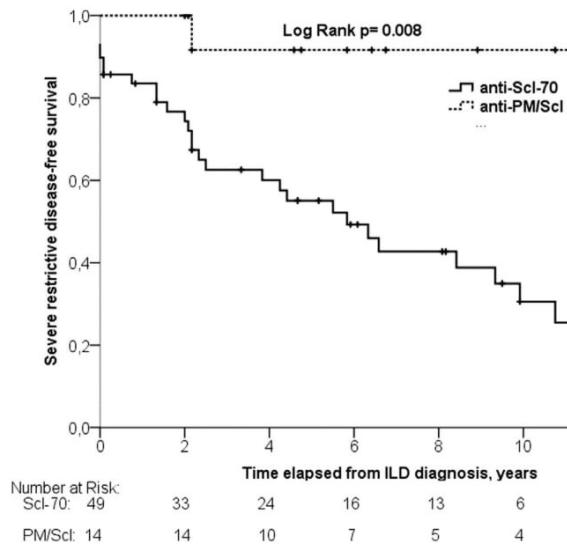


Fig. 2. The Kaplan-Meier survival plot of severe restrictive disease-free survival since ILD diagnosis. The end point was defined as developing FVC less than 50% or death.

which both showed a better prognosis of ILD in patients with anti-PM/Scl antibodies.

This good clinical course of anti-PM/Scl patients may be related with the antibody status, but we cannot forget the lower frequency of diffuse subset in our cohort or even a lower frequency of esophageal dysmotility [42], which may influence in a better prognosis of ILD.

The main limitation of the present study was the small sample size, although it was sufficient to indicate a different outcome between both groups of autoantibodies, it was not enough to perform a multivariate analysis. The duration of disease and censors during follow-up that affect retrospective studies may have produced a bias in the end points used. The lack of RHC data in all patients with PH may have falsely increased the prevalence of this severe complication.

In the last 20 years, the first cause of mortality in SSc has become lung affection, leaving SRC in the background [43]. This makes the study of prognostic factors correlated with a different course of the ILD increasingly more crucial. Multicentric and multivariate studies are needed to clarify the prognostic role of autoantibodies in pulmonary fibrosis.

Finally, the presence of anti-PM/Scl antibodies in patients with scleroderma and ILD involvement is associated with good outcome in lung parameters and PFS and less prevalence of restrictive lung disease. The present study has defined the prognosis of two subsets of SSc patients with ILD depending on their immunological profile. However, despite the presence of the same visceral involvement, the outcome of ILD is completely different, being more favorable in the anti-PM/Scl group.

Conclusion

The autoantibodies associated to SSc are not only related with a typical organ involvement but also are markers capable of impacting and modifying the severity of the SSc condition itself.

References

- Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Ramos-Casals M, Campillo-Grau M, et al. Registry of the Spanish network for systemic sclerosis: clinical pattern according to cutaneous subsets and immunological status. *Semin Arthritis Rheum* 2012;41:789–800.
- Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA Jr. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;37:1283–9.
- Greidinger EL, Flaherty KT, White B, Rosen A, Wigley FM, Wise RA. African-American race and antibodies to topoisomerase I are associated with increased severity of scleroderma lung disease. *Chest* 1998;114:801–7.
- Ioannidis JP, Vlachoyiannopoulos PG, Haidich AB, Medsger TA Jr, Lucas M, Michet CJ, et al. Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data. *Am J Med* 2005;118:2–10.
- Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35:35–42.
- Wolfe JF, Adelstein E, Sharp GC. Antinuclear antibody with distinct specificity for polymyositis. *J Clin Invest* 1977;59:176–8.
- Reichlin M, Maddison PJ, Targoff I, Bunch T, Arnett F, Sharp G, et al. Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis overlap syndromes. *J Clin Immunol* 1984;4:40–4.
- Reimer G, Scheer U, Peters JM, Tan EM. Immunolocalization and partial characterization of a nucleolar autoantigen (PM-Scl) associated with polymyositis/scleroderma overlap syndromes. *J Immunol* 1986;137:3802–8.
- Genth E, Mierau R, Genzkey P, von Muhlen CA, Kaufmann S, von Wilsmowski H, et al. Immunogenetic associations of scleroderma-related antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1990;33:657–65.
- Oddis CV, Okano Y, Rudert WA, Trucco M, Duquesnoy RJ, Medsger TA Jr. Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum* 1992;35:1211–7.
- Marguerie C, Bunn CC, Copier J, Bernstein RM, Gilroy JM, Black CM, et al. The clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to the nucleolar antigen PM-Scl. *Medicine (Baltimore)* 1992;71:327–36.
- Hausmanowa-Petrusewicz I, Kowalska-Olejcka E, Miller FW, Jarzabek-Chorzelska M, Targoff IN, Blaszczyk-Kostanecka M, et al. Clinical, serologic, and immunogenetic features in Polish patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 1997;40:1257–66.
- Vanderghenst F, Ocmant A, Sordet C, Humbel RL, Goetz J, Roufosse F, et al. Anti-pm/scl antibodies in connective tissue disease: clinical and biological assessment of 14 patients. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:129–33.
- Selva-O'Callaghan A, Labrador-Horrillo M, Solans-Laque R, Simeon-Aznar CP, Martinez-Gomez X, Vilardell-Tarrés M. Myositis-specific and myositis-associated antibodies in a series of eighty-eight Mediterranean patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum* 2006;55:791–8.
- Lega JC, Cottin V, Fabien N, Thivolet-Bejui F, Cordier JF. Interstitial lung disease associated with anti-PM/Scl or anti-aminoacyl-tRNA synthetase autoantibodies: a similar condition? *J Rheumatol* 2010;37:1000–9.
- Koschik RW 2nd, Fertig N, Lucas MR, Domsic RT, Medsger TA Jr. Anti-PM-Scl antibody in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30: S12–6.
- LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202–5.
- van den Hoogen F, Khanna D, Fries J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2013;65:2737–47.
- Bryan C, Howard Y, Brennan P, Black C, Silman A. Survival following the onset of scleroderma: results from a retrospective inception cohort study of the UK patient population. *Br J Rheumatol* 1996;35:1122–6.
- Simeon CP, Armadans L, Fonollosa V, Vilardell M, Candell J, Tolosa C, et al. Survival prognostic factors and markers of morbidity in Spanish patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:723–8.
- Jacobsen S, Halberg P, Ullman S. Mortality and causes of death of 344 Danish patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Br J Rheumatol* 1998;37:750–5.
- Hesselstrand R, Scheja A, Akesson A. Mortality and causes of death in a Swedish series of systemic sclerosis patients. *Ann Rheum Dis* 1998;57: 682–6.
- Simeon CP, Armadans L, Fonollosa V, Solans R, Selva A, Villar M, et al. Mortality and prognostic factors in Spanish patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:71–5.
- Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, 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;66:754–63.
- Joven BE, Almodovar R, Carmona L, Carreira PE. Survival, causes of death, and risk factors associated with mortality in Spanish systemic sclerosis patients: results from a single university hospital. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39:285–93.
- Traub YM, Shapiro AP, Rodnan GP, Medsger TA, McDonald RH Jr, Steen VD, et al. Hypertension and renal failure (scleroderma renal crisis) in progressive systemic sclerosis. Review of a 25-year experience with 68 cases. *Medicine (Baltimore)* 1983;62:335–52.
- Goh NS, Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM, Copley SJ, Maher TM, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1248–54.
- Wanger J, Clausen JL, Coates A, Pedersen OF, Brusasco V, Burgos F, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J* 2005;26: 511–22.
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26:319–38.

- [30] Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodriguez-Roisin R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986;22:217–24.
- [31] American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:646–64.
- [32] Raghu G, Brown KK, Bradford WZ, Starko K, Noble PW, Schwartz DA, et al. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2004;350:125–33.
- [33] Goh NS, Veeraghavan S, Desai SR, Cramer D, Hansell DM, Denton CP, et al. Bronchoalveolar lavage cellular profiles in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease are not predictive of disease progression. *Arthritis Rheum* 2007;56:2005–12.
- [34] Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Accardo S. Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000;27: 155–60.
- [35] Ghirardello A, Rampudda M, Ekholm L, Bassi N, Tarricone E, Zampieri S, et al. Diagnostic performance and validation of autoantibody testing in myositis by a commercial line blot assay. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:2370–4.
- [36] Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M, Reichenberger F, 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:R172.
- [37] Reimer G, Steen VD, Penning CA, Medsger TA Jr., Tan EM. Correlates between autoantibodies to nucleolar antigens and clinical features in patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1988;31:525–32.
- [38] De Santis M, Bosello SL, Peluso G, Pinnelli M, Alivernini S, Zizzo G, et al. Bronchoalveolar lavage fluid and progression of scleroderma interstitial lung disease. *Clin Respir J* 2012;6:9–17.
- [39] Steen V, Domsic RT, Lucas M, Fertig N, Medsger TA Jr. A clinical and serologic comparison of African American and Caucasian patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2012;64:2986–94.
- [40] Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:S43–54.
- [41] Bourous D, Wells AU, Nicholson AG, Colby TV, Polychronopoulos V, Pantelidis P, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1581–6.
- [42] Zhang XJ, Bonner A, Hudson M, Baron M, Pope J. Association of gastroesophageal factors and worsening of forced vital capacity in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2013;40:850–8.
- [43] Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972–2002. *Ann Rheum Dis* 2007;66:940–4.



Original Article

Prognostic Role of Exhaled Breath Condensate pH and Fraction Exhaled Nitric Oxide in Systemic Sclerosis Related Interstitial Lung Disease[☆]



Alfredo Guillen-del Castillo,^{a,*} Sara Sánchez-Vidaurre,^{b,c} Carmen P. Simeón-Aznar,^a María J. Cruz,^{b,c} Vicente Fonollosa-Pla,^a Xavier Muñoz^{b,c,d}

^a Unitat de Malalties Autoimmunes Sistèmiques, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Ciber de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Spain

^d Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2016

Accepted 6 September 2016

Available online 8 December 2016

Keywords:

Exhaled breath
Interstitial lung disease
Nitric oxide
pH
Systemic sclerosis

ABSTRACT

Introduction: Interstitial lung disease (ILD) is one of the major causes of death in systemic sclerosis (SSc). This study investigated exhaled breath (EB) and exhaled breath condensate (EBC) biomarkers in patients with SSc and analyzed their role as a prognostic tool in SSc-related ILD.

Methods: Fraction exhaled nitric oxide (FeNO) and exhaled carbon monoxide (eCO) measured in EB, together with pH, nitrite, nitrate and interleukin-6 levels measured in EBC were prospectively analyzed in 35 patients with SSc. Twelve patients had established ILD by chest high-resolution computed tomography (HRCT), and 23 patients showed no evidence of ILD. EB and EBC biomarkers were determined at inclusion, and pulmonary function tests were annually performed during 4 years of follow-up.

Results: No differences at baseline biomarkers levels were found between groups. In all patients studied, low EBC pH levels were associated with a decreased diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) during follow-up. Low FeNO levels were correlated with lower forced vital capacity (FVC) at baseline, 4 years of follow-up and with a decrease in FVC and DLCO during monitoring. Among ILD patients, high eCO levels were correlated with lower baseline FVC. In the global cohort, a worse progression-free survival was identified in patients with EBC pH values lower than 7.88 and FeNO levels lower than 10.75 ppb (log Rank $P=0.03$ and $P<0.01$, respectively).

Conclusions: EB and EBC could help to detect patients likely to present a deterioration on lung function during follow up.

© 2016 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Valor pronóstico del pH en el condensado de aire exhalado y de la fracción exhalada de óxido nítrico en la enfermedad pulmonar intersticial asociada a esclerosis sistémica

RESUMEN

Palabras clave:

Aire exhalado
Enfermedad pulmonar intersticial
Óxido nítrico
pH
Esclerosis sistémica

Introducción: La enfermedad pulmonar intersticial (EPI) es una de las principales causas de muerte en los pacientes con esclerosis sistémica (ES). En este estudio se investigaron biomarcadores en el aire exhalado (AE) y en el condensado de aire exhalado (CAE) y se analizó su posible papel como factores pronóstico de la EPI en pacientes con ES.

Métodos: Se analizó prospectivamente la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO) y el monóxido de carbono exhalado (COe) en AE, y se determinaron los valores de pH, nitritos, nitratos e interleucina-6 en

[☆] Please cite this article as: Guillen-del Castillo A, Sánchez-Vidaurre S, Simeón-Aznar CP, Cruz MJ, Fonollosa-Pla V, Muñoz X. Valor pronóstico del pH en el condensado de aire exhalado y de la fracción exhalada de óxido nítrico en la enfermedad pulmonar intersticial asociada a esclerosis sistémica. Arch Bronconeumol. 2017;53:120-127.

* Corresponding author.

E-mail address: alguille@vhebron.net (A. Guillen-del Castillo).

CAE, en 35 pacientes con ES. La tomografía computarizada de alta resolución (TACAR) torácica mostró signos de EPI en 12 pacientes, no estando presentes en los 23 restantes. En el momento de la inclusión se determinaron los biomarcadores en el AE y en el CAE, y durante los 4 años de seguimiento se efectuaron anualmente pruebas de función respiratoria.

Resultados: No se observaron diferencias entre grupos en los valores iniciales de los diferentes biomarcadores. En todos los pacientes examinados los valores disminuidos de pH en CAE se asociaron con una reducción en la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO) durante el seguimiento. Valores disminuidos de FeNO se correlacionaron con una menor capacidad vital forzada (FVC) inicial y a los 4 años, así como con una reducción de FVC y DLCO durante el seguimiento. En los pacientes con EPI los valores más altos de COe se correlacionaron con FVC más disminuidas al inicio. En el conjunto de la cohorte se identificó una menor supervivencia libre de progresión en los pacientes con un pH en CAE inferior a 7,88 y en los que presentaban un FeNO inferior a 10,75 ppb (Log Rank: $p = 0,03$ y $p < 0,01$, respectivamente).

Conclusiones: Los biomarcadores en el AE y en el CAE son útiles para detectar pacientes con una mayor probabilidad de presentar un deterioro de la función pulmonar durante el seguimiento de la enfermedad.

© 2016 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease characterized by small-vessel vasculopathy, fibroblast dysfunction with excessive collagen production, fibrosis, and immunological abnormalities.¹ Currently, interstitial lung disease (ILD) is one of the leading causes of SSc-related deaths.^{2,3} The prevalence of SSc-associated ILD varies depending on the population studied, case definition, and sensitivity of diagnostic methods. Goh et al.⁴ proposed a simple stratification scheme based on the extent of disease on high resolution computed tomography (HRCT) and the impact on pulmonary function testing (PFT), which yielded the best prediction of disease progression and long-term mortality. Recently, serum interleukin-6 (IL-6) has been reported as a predictor of SSc-ILD progression, specifically in patients with early-mild stages.⁵

An increase in inflammatory cells on bronchoalveolar lavage (BAL) is a common feature in SSc-related ILD.^{6,7} However, there is no correlation with long-term survival or progression,⁸ therefore it is only used to exclude an infection and for research purposes.³ Although the study of several biomarkers in induced sputum, exhaled breath (EB) and exhaled breath condensate (EBC) has been reported to be useful in scleroderma pulmonary involvement,⁹⁻¹³ their potential value is still controversial, and additional non-invasive biomarkers are needed to predict disease progression.

We sought to demonstrate that SSc-related ILD might be mediated by an autoimmune inflammatory process in the lung, causing a release of cytokines and metabolites that could be measured non-invasively in EB and/or EBC. This study had 2 main objectives: first, to analyze EB and EBC biomarkers in scleroderma patients based on the presence of ILD, and study their association with baseline PFTs; and secondly, to determine whether these biomarkers correlate with disease progression at 4 years, having a potential prognostic significance.

Methods

Patients

A prospective study was performed including 35 Caucasian patients (32 women) diagnosed with SSc. All patients fulfilled the ACR/EULAR 2013 classification criteria,¹⁴ had undergone a baseline HRCT, and were followed-up for 4 years. Patients were consecutively assessed in the Scleroderma Unit at our hospital and followed up by the same specialist every 4 months in moderate-severe ILD patients, or every 6 months in patients with no pulmonary involvement or mild ILD, following international guidelines.¹⁵ The

study was approved by the hospital's Ethics Committee for Clinical Research, and all the patients provided informed consent for their participation, according to the Declaration of Helsinki. The exclusion criteria were the presence of other inflammatory respiratory diseases (such as asthma, COPD or others), atopic features at inclusion, or an infection of the respiratory tract during the previous month.

Study Groups

The study population was divided into 2 groups: the ILD group included 12 patients with ILD defined as radiological evidence of interstitial disease on HRCT, containing 1 patient with pulmonary hypertension associated to ILD (PH-ILD); and 23 SSc patients with no evidence of ILD were selected as the control group, including 2 patients with isolated pulmonary arterial hypertension (PAH). PH was defined as mean pulmonary arterial pressure (mPAP) ≥ 25 mmHg in right heart catheterization (RHC). PH-ILD was considered if PH was diagnosed in a patient with ILD and lower than 60% predicted forced vital capacity (FVC) or moderate-severe interstitial disease in the HRCT.¹⁶ Isolated PAH was diagnosed by RHC according to international guidelines.^{16,17} Other SSc comorbidities were also recorded as previously described.¹⁸ All patients underwent complete PFTs, fraction of exhaled NO (FeNO), exhaled CO (eCO) and EBC collection at baseline. Subjects were instructed to refrain from food intake and smoking during the 2 and 24 h prior to sample collection, respectively. All samples were analyzed in the same laboratory.

Pulmonary Function Tests

Spirometry, static lung volumes and transfer lung studies were performed annually using MasterLab equipment (MasterLab, Jaeger, Germany) following the ERS-ATS recommendations.¹⁹ The PFTs outcomes were analyzed as the change in % predicted FVC or diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) compared to baseline.

Fraction of Exhaled NO Measurement

FeNO measurements were performed using NIOX MINO® device (Aerocrine AB, Solna, Sweden) according to current guidelines.²⁰ Patients sat in an upright position and wore a nose clip during the process. Patients inhaled NO-free air through the device and subsequently exhaled at a fixed flow rate of 50 mL/s for approximately 10 s. The first technically acceptable FeNO measurement was used for analysis.²¹

Table 1

Demographic Variables and Baseline Characteristics of the Patients Included in the Study.

	Global (n=35)	ILD (n=12)	Controls (n=23)	P-value
<i>Female</i>	32 (91.4)	10 (83.3)	22 (95.7)	0.26
<i>Age, years</i>	59.0 (42.0 to 68.0)	64.5 (52.5 to 70.2)	58.0 (36.0 to 67.0)	0.31
<i>Current smoker</i>	4 (11.4)	1 (8.3)	3 (13.0)	1.0
<i>LcSSc</i>	28 (80.0)	8 (66.7)	20 (87.0)	0.20
<i>Time from first symptom, years</i>	13.0 (3.5 to 28.3)	10.2 (1.5 to 35.4)	13.3 (5.0 to 28.3)	0.69
<i>Time from first non-RP symptom, years</i>	7.1 (1.5 to 12.6)	7.6 (1.7 to 10.0)	7.1 (1.5 to 13.3)	0.71
<i>ANA</i>	35 (100)	12 (100)	23 (100)	NA
ACA	18 (51.4)	5 (41.7)	13 (56.5)	0.40
Scl-70	4 (11.4)	3 (25.0)	1 (4.3)	0.10
<i>ILD</i>	12 (34.2)	12 (100)	0 (0)	<0.001
Disease duration ILD, years	–	1.4 (0.3 to 5.0)	–	NA
<i>PH</i>	3 (8.6)	1 (8.3)	2 (8.6)	1.0
PH-ILD	1 (2.9)	1 (8.3)	0 (0)	0.34
Isolated PAH	2 (5.7)	0 (0)	2 (8.6)	0.53
<i>Gastrointestinal involvement</i>	32 (91.4)	11 (91.7)	21 (91.3)	1.0
Esophageal dysmotility	30 (85.7)	11 (91.7)	19 (82.6)	0.64
Gastric involvement	7 (20.0)	2 (2.4)	5 (21.7)	1.0
<i>Cardiac involvement</i>	13 (37.1)	6 (50.0)	7 (30.4)	0.29
<i>Renal chronic failure</i>	1 (2.9)	0 (0)	1 (4.3)	1.0
<i>Arterial hypertension</i>	10 (28.6)	3 (25.0)	7 (6.6)	1.0
<i>Dyslipidemia</i>	2 (5.7)	1 (8.3)	1 (4.3)	1.0
<i>Diabetes mellitus</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
<i>Immunosuppressant therapy</i>	7 (20)	5 (41.7)	2 (8.7)	0.03
Prednisone ≤5 mg/day	5 (14.3)	3 (25.0)	2 (8.7)	0.31
Sodium mycophenolate	4 (11.4)	3 (25.0)	1 (4.3)	0.10
IV Cyclophosphamide	1 (2.9)	1 (8.3)	0 (0)	0.34
<i>Non-immunosuppressant drugs</i>	35 (100)	12 (100)	23 (100)	1.0
Proton pump inhibitors	35 (100)	12 (100)	23 (100)	1.0
Calcium channel blockers	22 (62.9)	7 (58.3)	15 (65.2)	0.72
Antiplatelet therapy	15 (42.9)	6 (50.0)	9 (39.1)	0.72
ACEI or ARB	10 (28.6)	1 (8.3)	9 (39.1)	0.11
N-acetylcysteine	2 (5.7)	2 (16.7)	0 (0)	0.11
NO donors therapy	2 (5.7)	0 (0)	2 (8.7)	0.53

Data shown as median (interquartile range, IQR) for continuous variables and n (%) for categorical variables. ACA: anticentromere antibodies; ACEI: angiotensin converting enzyme inhibitors; ANA: antinuclear antibodies; ARB: angiotensin II receptor blockers; LcSSc: limited systemic sclerosis; ILD: interstitial lung disease; IV: intravenous; NA: not applicable; PAH: pulmonary arterial hypertension; PH: pulmonary hypertension; RP: Raynaud's phenomenon.

Table 2

HRCT, PFTs, Echocardiography, Exhaled Breath and Exhaled Breath Condensate Biomarkers at Baseline.

	ILD (n=12)	Controls (n=23)	P-value
<i>HRCT findings</i>			
Ground-glass opacities	12 (100)	0 (0)	<0.001
Reticular opacities	11 (91.7)	0 (0)	<0.001
Honeycombing	6 (50.0)	0 (0)	<0.01
1 (8.3)	0 (0)	0 (0)	0.36
<i>Pulmonary function test</i>			
FVC ^a	73.3 (62.3 to 91.9)	90.9 (83.7 to 103.0)	0.03
FEV ₁ ^a	81.2 (65.7 to 108.4)	98.9 (85.2 to 107.9)	0.09
FEV ₁ % (FEV ₁ /FVC)	80.9 (76.1 to 88.3)	80.6 (76.0 to 83.2)	0.13
TLC ^a	82.7 (70.9 to 92.6)	104.3 (95.8 to 111.5)	0.001
DLCO ^a	47.7 (41.2 to 59.1)	70.9 (59.1 to 86.6)	<0.01
KCO ^a	55.2 (46.9 to 66.5)	67.3 (63.6 to 85.3)	0.02
<i>Echocardiography</i>			
RVSP, mm Hg	35.0 (29.5 to 45.0)	31.0 (25.5 to 41.2)	0.60
<i>Exhaled breath</i>			
FeNO, ppb	10.5 (7.5 to 16.5)	12.0 (9.2 to 20.7)	0.23
eCO, ppm	3.0 (2.0 to 4.0)	3.0 (2.0 to 8.2)	0.77
<i>Exhaled breath condensate</i>			
pH	7.5 (6.9 to 7.9)	8.0 (7.4 to 8.2)	0.05
Nitrite, μM	3.7 (1.9 to 5.8)	3.2 (1.4 to 4.8)	0.57
Nitrate, μM	6.4 (3.5 to 10.9)	8.7 (5.8 to 13.8)	0.38
IL-6, pg/mL	0.06 (0.03 to 0.10)	0.07 (0.05 to 0.10)	0.61

DLCO: carbon monoxide diffusing capacity; eCO: exhaled carbon dioxide; FeNO, fraction of exhaled nitric oxide; FEV₁: forced expiratory volume in first second; FEV₁%; FEV₁/FVC ratio expressed as percentage; FVC: forced vital capacity; HRCT: high resolution computed tomography; IL-6: interleukin-6; ILD: interstitial lung disease; KCO: transfer coefficient; NA: not applicable; RVSP: right ventricular systolic pressure; TLC: total lung capacity.

^a Percentage of predicted value.

Data expressed as median (IQR).

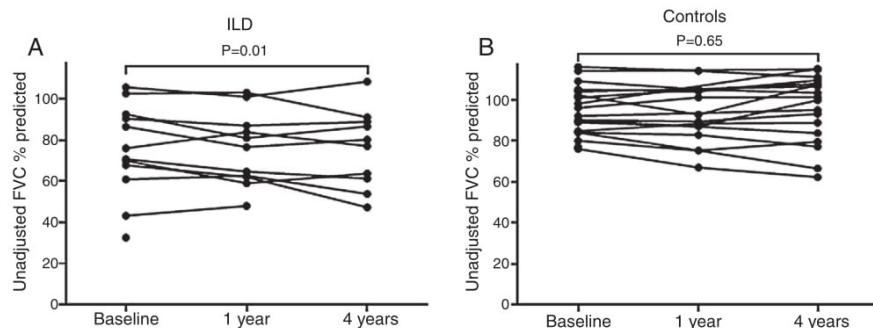


Fig. 1. FVC values at baseline and during follow-up. A and B show the unadjusted variation of % predicted FVC during follow up (each point represents a patient) for ILD patients and controls, respectively. In the ILD group, we observed a decrease of 6.4% in the mean unadjusted FVC % predicted values during the 4-year period compared to baseline (95% CI: -11.2 to -1.6; $P=0.01$) (A), whereas no significant differences were found in the control group (B). A higher decline of FVC % was found in ILD group than controls ($P<0.01$).

Exhaled CO Measurement

Exhaled CO was measured by a MicroCO Meter (MicroCO - Micro Medical Ltd, Rochester, Kent, UK), using an electrochemical sensor. Patients were instructed to breath deeply to total lung capacity, to hold the breath for 20 s, and then to exhale slowly and completely through a mouthpiece. Two successive recordings were made and maximal values were used in all calculations.

EBC Samples Collection and Processing

EBC was collected during tidal breathing with a commercially available condenser (EcoScreen; Jaeger, Würzburg, Germany). Subjects breathed tidally through a mouthpiece connected to the condenser while wearing nose clips. A fixed volume of 150 L of exhaled breath was collected per subject.²² EBC samples were processed in sampling tubes and divided into 500 μ L aliquots. One aliquot was used to measure the pH after deaeration, and the remaining were immediately stored at -70 °C, and analyzed within 1 month of collection.

EBC pH was measured after deaeration with helium (350 mL/min for 10 min), using a calibrated pH meter (Model GLP 21; Crison Instruments SA; Barcelona, Spain) with an accuracy of ± 0.01 pH, and a probe for small volumes (Crison 50 28; Crison Instruments SA; Barcelona, Spain). The probe was calibrated daily with standard pH 7.02 and 4.00 buffers.²³

EBC nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) levels were determined with a colorimetric assay based on the Griess reaction (Cayman Chemical Company, USA). The concentrations were measured at 540 nm absorbance with a microplate reader. Assay sensitivity was 1 μ M for nitrite and 2.5 μ M for nitrate.

IL-6 levels in EBC samples were evaluated by a commercially available high sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Bender MedSystems GmbH, Austria). Assay sensitivity was 0.03 pg/mL.

Statistical Analysis

Non-parametric tests were performed to assess the presence of statistically significant differences. Categorical data were analyzed by chi-square and Fisher's exact tests. Continuous data were analyzed using the Mann-Whitney U test in the between-groups differences and Wilcoxon signed rank test in within-group comparisons. Associations between variables were analyzed using Spearman's correlation. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves and Youden's index method were used to determine the threshold value of each biomarker, which demonstrated the best sensitivity and specificity to predict a decrease of 10% in FVC, a

15% in DLCO or death. Log Rank test was used to measure the progression-free survival (PFS) in the follow-up, whose endpoint was the occurrence of combined damaging events, defined as a 10% decrease in FVC, a 15% decrease in DLCO from baseline, or death. A P value <0.05 was considered significant. SPSS version 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago) and GraphPad InStat4 (GraphPad Software Inc., San Diego) were used to carry out the statistical analyses.

Results

Baseline Data

Demographic data and baseline characteristics of the study population are shown in Table 1. Median (interquartile range, IQR) age was 59.0 (42.0 to 68.0) years. HRCT was consistent with non-specific interstitial pneumonia (NSIP) in all ILD patients, whereas no ILD findings were observed in controls. The median of pulmonary disease duration was 1.4 years in the ILD group. At inclusion, 7 patients were taking immunosuppressive therapy.

Baseline imaging, PFTs and biomarkers are described in Table 2. Significant differences at baseline were found between the study groups in the FVC, TLC, DLCO and KCO, with lower values in the ILD group. EB and EBC biomarkers were analyzed in both groups of patients at baseline. No statistical differences were found in FeNO or eCO levels. However, FeNO was positively associated with baseline FVC ($r=0.41$, $P=0.03$). In the ILD group, a negative correlation was found between eCO levels and baseline FVC ($r=-0.75$, $P<0.01$). No significant differences in EBC biomarkers were found between the 2 study groups. However, analyzing 11 patients with ground-glass opacities in the HRCT, the median of EBC pH was significantly lower than in patients without this radiographic pattern (7.4 vs. 8.0, $P=0.02$). No other association was observed in terms of HRCT findings with baseline biomarkers.

A substudy excluding the 7 patients taking immunosuppressive therapies found the same differences in baseline PFTs and EB and EBC biomarkers.

Follow-up Data

A patient from the control group with baseline EBC pH of 8.09 and FeNO of 14.5 ppb developed mild ILD diagnosed by HRCT with FVC higher than 70% at 45 months of follow-up, and thereafter presented PH-ILD identified by RHC at 47 months of follow-up. Four patients died during follow-up, 2 from the ILD group and 2 controls: one due to PAH and due to a stroke.

Figs. 1 and 2 show FVC and DLCO values, respectively, in the 2 study groups during the follow-up period.

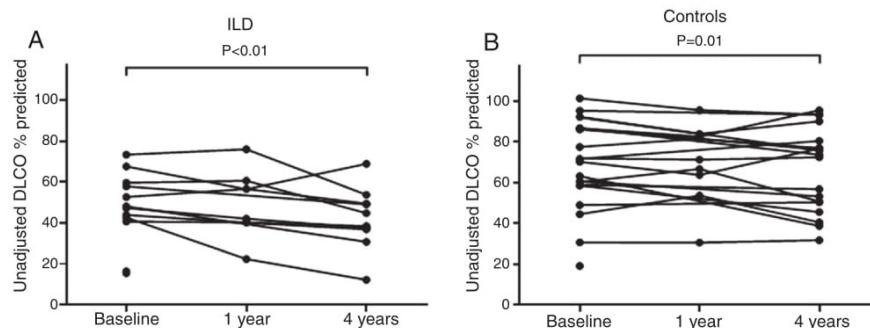


Fig. 2. DLCO values at baseline and during follow-up. A and B show the unadjusted variation of % predicted DLCO during follow up (each point represents a patient) for ILD patients and controls, respectively. DLCO values were significantly lower at 4 years of follow-up compared to baseline in the ILD group, with a mean decrease of 11.1% (95% CI: -18.0 to -4.3; $P<0.01$) (A), and in controls, with a mean decline of 5.5% (95% CI: -10.0 to -1.1; $P=0.01$) (B).

Correlations between EBC biomarkers and PFTs are shown in Fig. 3. In all patients, low pH values were correlated with lower DLCO at 4 years of follow-up (Fig. 3A). Furthermore, low FeNO levels were associated with lower FVC at 4 years of follow-up (Fig. 3B). Low baseline FeNO levels were related to a decrease of FVC and DLCO at 4 years of follow-up (Fig. 3C and D). In ILD patients, a negative correlation was found between high eCO levels and lower FVC at the end of follow-up ($r=-0.66$; $P=0.03$). In addition, we observed a trend towards correlation between high IL-6 levels and lower DLCO at end of study in SSc-ILD patients ($r=-0.53$; $P=0.10$). There were no statistical differences in the associations of the remaining EBC biomarkers.

ROC curves were used to quantify the accuracy of each baseline biomarker to predict functional decline or death. The area under

the curve (AUC) for EBC pH was 0.65 (95% CI: 0.41 to 0.89; $P=.23$), and a threshold value of 7.88 was established using Youden's index method, with a sensitivity of 0.71 and a specificity of 0.58. AUC for FeNO was 0.81 (95% CI: 0.65 to 0.96; $P=0.01$), and showed a threshold of 10.75 ppb, with a sensitivity and specificity of 0.85 and 0.77, respectively. Kaplan-Meier curves illustrate the PFS according to the former cut-off values of pH and FeNO (Fig. 4). EBC pH lower than 7.88 showed a decrease in lung function parameters or death during follow-up (log Rank $P=0.03$). FeNO levels lower than 10.75 ppb were related to worse PFS (log Rank $P<0.01$). There were no statistical differences in survival related to baseline eCO levels.

In the substudy excluding patients taking immunosuppressive therapies, the AUC for EBC pH was 0.66 (95% CI: 0.44 to 0.88; $P=0.18$), with the same threshold value of 7.88, although there

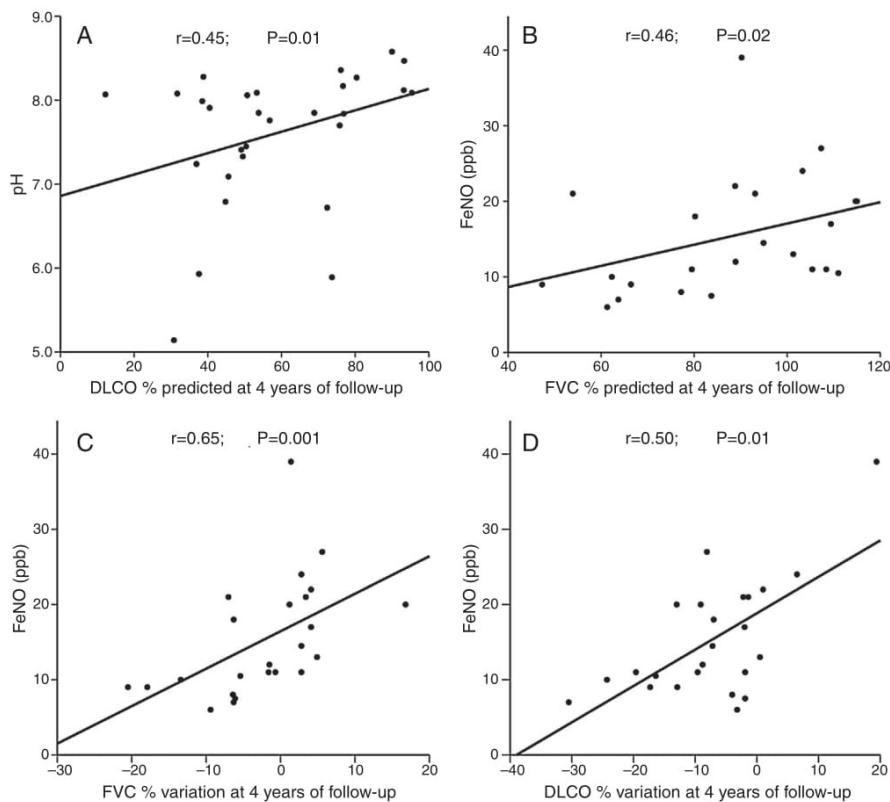


Fig. 3. Correlation between EBC pH and FeNO with pulmonary function tests. The figure shows correlations including all patients. Variations of FVC and DLCO % were calculated in respect of baseline parameters (PFTs at 4 years minus baseline PFTs). FeNO, Fraction of exhaled NO.

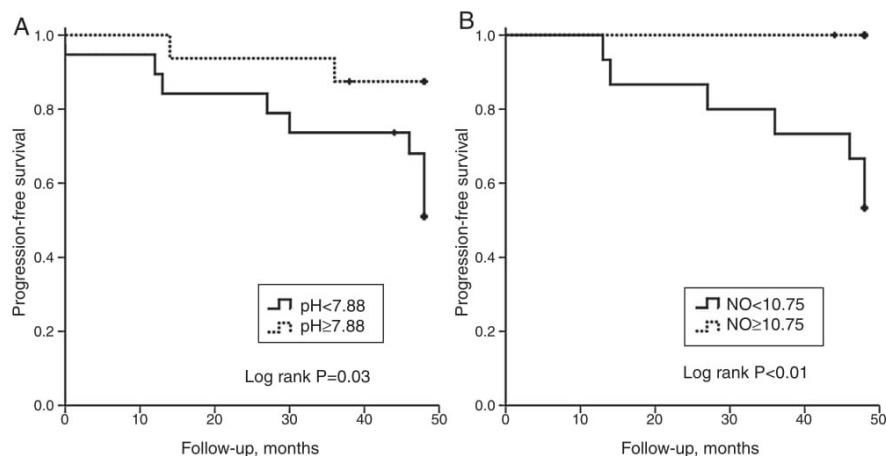


Fig. 4. Kaplan-Meier survival plots representing progression-free survival since EBC collection. The end point was defined as a decrease from baseline FVC of at least 10%, or a 15% decrease in DLCO, or death during follow-up. (A) The survival plot found a better progression-free survival in patients with EBC pH values equal to or higher than 7.88. (B) The survival plot showed a higher progression-free survival in patients with FeNO levels equal to or greater than 10.75 ppb.

were no statistical differences in PFS (log Rank $P=0.09$). Regarding FeNO assays, the AUC was 0.88 (95% CI: 0.74 to 1.0; $P=0.18$), with a threshold of 10.25 ppb, with a sensitivity and specificity of 0.80 and 0.84, respectively. Furthermore, worse PFS was identified in patients with FeNO levels under 10.25 ppb (log Rank $P<0.01$).

Discussion

In all the SSc patients studied, low EBC pH or FeNO values were related to worse PFS during 4 years of follow-up. In patients with ILD, high eCO levels were associated with lower FVC at baseline and at 4 years of follow-up, although this was not shown to be prognostic.

In our study, only 1 patient from the control group developed ILD at 45 months of follow-up, showing high baseline EBC pH and FeNO levels. This shows that EBC biomarkers are not suitable for long-term prediction of SSc-ILD, but unfortunately we have no short-term data to verify these results.

Several studies have previously shown that EBC pH values may fall in non-controlled asthma, in respiratory infections in patients with bronchiectasis, COPD or cystic fibrosis.²⁴ However, in interstitial lung diseases, higher values have been found in pulmonary fibrosis,²⁵ and values are diminished in asbestos.²⁶ There are no studies in scleroderma as a marker of disease or prognosis. We found lower levels of EBC pH in patients with ground-glass opacities in HRCT, supporting the hypothesis that EBC biomarkers could be influenced by the type of inflammation present in the lungs. The prognostic role of EBC pH diminished when only non-immunosuppressed patients were studied, which can be explained by the exclusion of the most severe ILD patients and the smaller population analyzed. Inflammatory processes trigger a range of mechanisms which produce acidification of proximal airways as a possible innate defense mechanism.²⁷ These mechanisms are the production and excretion of superoxide ions and protons by the respiratory epithelial cells, the inhibition of glutaminase activity in epithelial cells, and finally the recruitment of macrophages and neutrophils which lyse, thereby increase the acidity of the environment.²⁸ Although the presence of lymphocytic inflammation in the alveoli is characteristic in scleroderma, neutrophilic inflammation has been shown in the bronchi, which is most marked in patients with pulmonary fibrosis.¹³ In fact, the acidification produced by neutrophil recruitment may well explain this inflammatory component.

With regard to IL-6, a previous transversal study negatively correlated this cytokine measured in EBC with TLC, DLCO and KCO at the moment of ILD assessment.⁹ In BAL, increased levels of IL-6 in SSc-ILD have been found.²⁹ Recently, high IL-6 serum levels have been related to spirometry decline or death within the first year in patients with milder ILD disease.⁵ Similarly, we reported a trend towards association between high baseline IL-6 levels and lower DLCO at the end of follow-up.

In this study, using FeNO at a flow rate of 50 mL/s, low baseline NO levels were correlated with baseline FVC and with a decline in both FVC and DLCO at 4 years of follow up. This study is the first to demonstrate the prognostic role of FeNO in SSc-ILD, where baseline levels lower than 10.75 ppb were correlated with worse PFS. FeNO represents the quantity of NO exhaled as a mixture of the alveolar concentration of exhaled NO (CaNO) and NO diffused from the airway wall (JawNO).³⁰ At flow rates greater than 50 mL/s, the alveolar concentration of NO to the total fraction predominates, but slower rates represent airway diffusion.³¹ Moodley et al. found higher NO levels in SSc patients with no pulmonary fibrosis compared to patients with SSc-ILD or controls.³² Malerba et al. also showed lower FeNO levels in SSc-ILD than in patients without ILD.³³ Others authors compared FeNO in SSc patients with no statistical differences between patients with or without ILD, even compared with healthy controls.³⁴ Although difference were not statistically significant, our study and all previous studies have described lower FeNO levels in SSc patients with ILD than in patients without this organ injury.^{34,35}

However, reports focused on analyzing CaNO have observed that this parameter is increased in SSc patients compared with healthy control subjects³⁶ and is also particularly increased in SSc patients with ILD.^{12,35} High CaNO levels have been associated with decline of lung function or death, with a specificity of 90%.¹²

In our study, the selected flow rate may have been affected due to a low representation of alveolar space. Additionally, CaNO was not measured, which inhibits the exploration of divergent results compared with FeNO. Reduced FeNO levels may be explained by restricted NO production by NO synthase in proximal airways, as a consequence of an inhibition due to high CaNO levels secondary to inflammation of the lungs, with high alveolar generation by inducible NO synthase. Nevertheless, our data demonstrate that SSc patients with lower levels of FeNO present a worse outcome during follow-up, which may indicate the presence of an aggressive ILD. Because FeNO and CaNO represent different breath components,

further studies would be necessary to elucidate the pathophysiological role of NO in SSc-related ILD.

A novel result reported in this study is the correlation between higher levels of eCO and lower baseline FVC and at 4 years of follow-up in SSc-ILD patients, although this finding has not been shown to be a prognostic factor. It is well known that many inflammatory lung diseases course with high eCO levels.³⁷ To our knowledge, no studies have been conducted on scleroderma, although some authors have supported the possibility that pathologies with micro-circulatory alterations could increase endogenous levels of CO.^{13,38} The fact that only 1 of the ILD patients was a current smoker and was instructed to avoid smoking enabled us to rule out tobacco as the factor responsible for this relationship.

The main limitation of the study was the small sample size, which prevented us from performing a multivariate analysis. The duration of pulmonary involvement was not homogeneous, which may have underestimated some inflammatory biomarkers due to the inclusion of patients in later stages of disease with lower lung inflammation status. Seven patients were taking immunosuppressants, which may have affected the baseline biomarkers levels. However, in the substudy excluding those patients, no substantial differences were observed, except that EBC pH was not found to have a prognostic value. The lack of measurement standardization in those biomarkers may be a limitation, as well as the non-repeatability of EBC data in studies including SSc-related ILD patients. Finally, FeNO and CaNO levels could not be correlated due to lack of CaNO data in SSc patients.

ILD has become one of the major causes of mortality in SSc, and this is why every effort must be made to find prognostic markers for this disease. This study is the first to establish the prognostic role of EBC pH, FeNO, and to analyze eCO in SSc-related ILD. Therefore, our data should be confirmed in further studies in order to clarify the correlation between FeNO and CaNO levels in scleroderma patients. In this regard, biomarkers in EB or EBC could be relevant for the management of SSc-ILD with the aid of non-invasive tests. This will lead to the identification of patients most at risk of deterioration who should be closely monitored.

Funding

A. Guillen-Del Castillo is a researcher supported by the Contratos Predoctorales de Formación en Investigación (PFIS) grant from Instituto de Salud Carlos III [FI14/00643]. M.J. Cruz is a researcher supported by the Miguel Servet programme from Instituto de Salud Carlos III [CP12/03101].

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest directly or indirectly related to the manuscript contents.

References

1. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med.* 2009;360:1989-2003.
2. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:940-4.
3. Solomon JJ, Olson AL, Fischer A, Bull T, Brown KK, Raghu G. Scleroderma lung disease. *Eur Respir Rev.* 2013;22:6-19.
4. Goh NS, Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM, Copley SJ, Maher TM, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:1248-54.
5. De Lauretis A, Sestini P, Pantelidis P, Hoyles R, Hansell DM, Goh NS, et al. Serum interleukin 6 is predictive of early functional decline and mortality in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2013;40:435-46.
6. Antoniou KM, Wells AU. Scleroderma lung disease: evolving understanding in light of newer studies. *Curr Opin Rheumatol.* 2008;20:686-91.
7. Silver RM, Wells AU. Histopathology and bronchoalveolar lavage. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47 Suppl 5:62-4.
8. Goh NS, Veeraraghavan S, Desai SR, Cramer D, Hansell DM, Denton CP, et al. Bronchoalveolar lavage cellular profiles in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease are not predictive of disease progression. *Arthritis Rheum.* 2007;56:2005-12.
9. Edme JL, Tellart AS, Launay D, Neviere R, Grutzmacher C, Boulenguez C, et al. Cytokine concentrations in exhaled breath condensates in systemic sclerosis. *Inflamm Res.* 2008;57:151-6.
10. Tufvesson E, Bozovic G, Hesselstrand R, Bjermer L, Scheja A, Wuttge DM. Increased cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostanate in exhaled breath condensate from systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49: 2322-6.
11. Wuttge DM, Bozovic G, Hesselstrand R, Aronsson D, Bjermer L, Scheja A, et al. Increased alveolar nitric oxide in early systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28:S5-9.
12. Tieb KP, Hua-Huy T, Kettaneh A, Allanore Y, Le-Dong NN, Duong-Quy S, et al. Alveolar concentration of nitric oxide predicts pulmonary function deterioration in scleroderma. *Thorax.* 2012;67:157-63.
13. Sanchez-Vidaurre S, Simeon CP, Cruz MJ, Fonollosa V, Vilardell M, Morell F, et al. Latent pulmonary inflammation in patients with systemic sclerosis. *Arch Bronconeumol.* 2012;48:8-13.
14. Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2013;65:2737-47.
15. Kowal-Bielecka O, Landewe R, Avouac J, Chwiesko S, Miniti I, Czirjak L, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis.* 2009;68:620-8.
16. Coghlan JG, Denton CP, Grunig E, Bonderman D, Distler O, Khanna D, et al. Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. *Ann Rheum Dis.* 2014;73: 1340-9.
17. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, 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 (AEP), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J.* 2015;46:903-75.
18. Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Campillo-Grau M, Ramos-Casals M, et al. Registry of the Spanish Network for Systemic Sclerosis: survival, prognostic factors, and causes of death. *Medicine.* 2015;94:e1728.
19. Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, et al. General considerations for lung function testing. *Eur Respir J.* 2005;26:153-61.
20. American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:912-30.
21. Menzies D, Nair A, Lipworth BJ. Portable exhaled nitric oxide measurement: comparison with the gold standard technique. *Chest.* 2007;131: 410-4.
22. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005;26:523-48.
23. Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TA, et al. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:694-9.
24. Kostikas K, Papathodorou G, Ganias K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1364-70.
25. Chow S, Thomas PS, Malouf M, Yates DH. Exhaled breath condensate (EBC) biomarkers in pulmonary fibrosis. *J Breath Res.* 2012;6:016004.
26. Chow S, Campbell C, Sandrini A, Thomas PS, Johnson AR, Yates DH. Exhaled breath condensate biomarkers in asbestos-related lung disorders. *Respir Med.* 2009;103:1091-7.
27. Gaston B, Hunt JF. Measurement of exhaled breath condensate pH: implications for pathophysiology and monitoring of inflammatory airway diseases. In: Montuschi P, editor. *New perspectives in monitoring lung inflammation: analysis of exhaled breath condensate.* Washington, DC: CRC Press; 2005. p. 73-84.
28. Montuschi P. Analysis of exhaled breath condensate: Methodological issues. In: Montuschi P, editor. *New perspectives in monitoring lung inflammation: analysis of exhaled breath condensate.* Washington, DC: CRC Press; 2005. p. 11-30.
29. Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, Witt C, Meisel C, Hanitsch LG, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R111.
30. George SC, Hogman M, Permutt S, Silkoff PE. Modeling pulmonary nitric oxide exchange. *J Appl Physiol.* 2004;96:831-9.
31. Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol.* 1998;85:653-66.
32. Moodley YP, Laloo UC. Exhaled nitric oxide is elevated in patients with progressive systemic sclerosis without interstitial lung disease. *Chest.* 2001;119:1449-54.

33. Malerba M, Radaeli A, Ragnoli B, Airo P, Corradi M, Ponticiello A, et al. Exhaled nitric oxide levels in systemic sclerosis with and without pulmonary involvement. *Chest*. 2007;132:575-80.
34. Teiv KP, Cabane J, Aubourg F, Kettaneh A, Ziani M, Mounthon L, et al. Severity of scleroderma lung disease is related to alveolar concentration of nitric oxide. *Eur Respir J*. 2007;30:26-30.
35. Girgis RE, Gugnani MK, Abrams J, Mayes MD. Partitioning of alveolar and conducting airway nitric oxide in scleroderma lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1587-91.
36. Fajac I, Kahan A, Menkes CJ, Dessanges JF, dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT. Increased nitric oxide in exhaled air in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 1998;16:547-52.
37. Ryter SW, Choi AM. Carbon monoxide in exhaled breath testing and therapeutics. *J Breath Res*. 2013;7:017111.
38. Hughes JM. The single breath transfer factor (TLCO) and the transfer coefficient (KCO): a window onto the pulmonary microcirculation. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2003;23:63-71.

High Sensitivity and Negative Predictive Value of DETECT Algorithm for an Early Diagnosis of Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis: application in a single center

Authors' names:

Alfredo Guillen-Del Castillo ¹	alguillen@vhebron.net
Eduardo L Callejas-Moraga ¹	ecallejas@vhebron.net
Gabriela García ²	gabitagarcia@hotmail.com
José F Rodríguez-Palomares ²	jfrodrig@vhebron.net
Antonio Román ³	aroman@vhebron.net
Cristina Berastegui ³	cberaste@vhebron.net
Manuel López-Meseguer ³	manuellopez@vhebron.net
Enric Domingo ²	enrdomin@vhebron.net
Vicente Fonollosa-Pla ¹	vfonollosa@vhebron.net
Carmen Pilar Simeón-Aznar ¹	cpsimeon@vhebron.net

Institutional addresses:

¹Department of Systemic Autoimmune Diseases, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Department of Cardiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³Department of Pneumology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Corresponding author: Alfredo Guillen-Del Castillo, MD, Department of Systemic Autoimmune Diseases, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-

129, PC: 08035, Barcelona, Spain. Telephone: +34 932746003 / fax: +34 932746171. E-mail: alguille@vhebron.net.

ABSTRACT

Background: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is one of the most relevant causes of death in systemic sclerosis. The aims of this study were to analyse the recently published DETECT algorithm comparing with ESC/ERS 2009 guidelines: 1) as screening of PAH; 2) identifying median pulmonary arterial pressure (mPAP) ≥ 21 mmHg; 3) determining any group of pulmonary hypertension (PH).

Methods: Eighty-three patients fulfilling LeRoy's systemic sclerosis diagnostic criteria with at least a right heart catheterization were studied retrospectively. Clinical data, serological biomarkers, echocardiographic and hemodynamic features were collected. SPSS 20.0 was used for statistical analysis.

Results: According to right heart catheterization findings, 35 PAH and 28 no-PH patients met the standards for DETECT algorithm analysis. Functional class III/IV was presented in 27.0% of patients. Applying DETECT, the sensitivity was 100%, specificity 42.9%, the positive predictive value 68.6% and the negative predictive value 100%, whereas employing the ESC/ERS guidelines these were 91.4%, 85.7%, 88.9% and 89.3%, respectively. No missed diagnosis of PAH were using DETECT compared with 3 (8.5%) patients using ESC/ERS guidelines. DETECT algorithm also showed greater sensitivity and negative predictive value to identify mPAP ≥ 21 mmHg patients or any sort of PH.

Conclusions: DETECT algorithm is confirmed as an excellent screening method due to its high sensitivity and negative predictive value, minimizing the missed diagnosis of PAH. DETECT would be accurate either for an early diagnosis of borderline mPAP or any group of PH.

Keywords: Systemic sclerosis; Pulmonary Arterial Hypertension; Echocardiography; Screening tools.

BACKGROUND

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by inflammation and autoimmunity, aberrant tissue reparation with excessive extracellular matrix deposition and altered vascular regeneration and endothelial injury [1, 2]. Pulmonary arterial hypertension (PAH) is one of the most severe complications in SSc patients, in which prevalence is 10% diagnosed by right heart catheterization (RHC) [3, 4]. PAH is a major negative impact on survival and has become one of the leading causes of systemic sclerosis (SSc)-related deaths [5-7]. The outcome of this disease unfortunately is poor, with 51% survival at 5 years of diagnosis even after the introduction of potent vasodilatator agents [8]. Despite being SSc a well-known risk factor for developing PAH, there is still a diagnosis delay for PAH and consequently more than 80% of patients present World Health Organization (WHO) functional class III or IV at this point [8].

A French nationwide prospective multicentre study proposed a strategy for an early PAH diagnosis using Doppler echocardiography prior to referral to RHC compared to routine clinical practice [9]. Later on, authors demonstrated a prompt PAH identification in lower functional classes and subsequently 4-fold superior survival ratio [10]. The European Society of Cardiology and the European Respiratory Society (ESC/ERS) guidelines published in 2009 [11], recommended echocardiography in symptomatic patients. RHC was carried out if tricuspid regurgitant velocity (TRV) was

equal or greater than 2.9 m/s or if other echocardiographic signs of pulmonary hypertension were present.

Recently, Coghlan *et al.* reported the first evidence-based algorithm for the screening of PAH in SSc (DETECT) [12]. DETECT algorithm is a tool to identify PAH patients in asymptomatic stages through the study of clinical variables, pulmonary function tests, immunological, biological, electrocardiographic and finally echocardiographic parameters. Authors demonstrated higher sensitivity of PAH detection than ESC/ERS 2009 guidelines.

The main aim of this study was to determine the value of DETECT algorithm in a different SSc population from the original work and comparing with ESC/ERS 2009 guidelines. Other objectives were to ascertain the ability of DETECT to predict median pulmonary arterial pressure (mPAP) ≥ 21 mmHg or predict pulmonary hypertension (PH) *versus* non-PH.

METHODS

Patients

Eighty-three SSc patients with at least one performed RHC were studied retrospectively. The RHC was indicated due to suspicion of PAH after undergoing annual complete pulmonary function test and annual echocardiography as routine monitoring of SSc patients. The reasons for carrying out the RHC in our population were the presence of a right ventricular systolic pressure (RVSP) > 36 mmHg plus a forced vital capacity / diffusing capacity for carbon monoxide (FVC/DLCO) ratio > 1.6 in 35 patients, 34 patients had a RVSP > 36 mmHg, 8 patients presented a FVC/DLCO

ratio > 1.6, and 6 patients suffered exclusively from a progressive unexplained dyspnoea. All patients fulfilled LeRoy's SSc diagnostic criteria [13], and 80 also met ACR/EULAR 2013 classification criteria [14]. The duration of disease was more than 3 years from the first non-Raynaud's phenomenon symptom in all cases. For the validation of DETECT algorithm, 4 patients were excluded for presenting FVC lower than 40% predicted, and another for not meeting the inclusion criteria due to a DLCO equal or higher than 60%.

Comparisons of DETECT algorithm and ESC/ERS 2009 guidelines

Three different scenarios were conducted for the comparison of DETECT algorithm with ESC/ERS 2009 guidelines: First, 35 patients diagnosed with PAH and 28 with non-PH after undergoing RHC were selected for the application of DETECT algorithm (see figure 1). Second, these 63 patients were used to explore the capacity of both screening tests to identify mPAP ≥ 21 mmHg (both borderline mPAP and PAH). Third, with neither inclusion nor exclusion criteria 52 patients diagnosed with PH and 31 with non-PH were selected to investigate the detection of any sort of PH.

Data collection

Data from first available RHC of each patient was revised. PH was defined as mPAP ≥ 25 mmHg in RHC, and was classified in the following groups: WHO group 1 or PAH, was defined if pulmonary artery wedge pressure (PAWP) was ≤ 15 mmHg and pulmonary vascular resistance (PVR) was > 3 Wood units in RHC [15]; WHO group 2 or PH associated to left heart disease, if PAWP was > 15 mmHg; WHO group 3 or PH related to interstitial lung disease (ILD), if PAWP was ≤ 15 mmHg and predicted FVC lower than 60% or there were a moderate-severe extent of interstitial disease in the high

resolution computed tomography (HRCT) [12]. Borderline mPAP (BoPAP) was considered if mPAP was between 21 and 24 mmHg, with a PAWP \leq 15 mmHg and there was no ILD or FVC was $>$ 60% patients [16].

Based on the extent of skin involvement, patients were divided into diffuse cutaneous SSc (dcSSc) if thickening of skin was distal and proximal to elbows or knees, limited cutaneous SSc (lcSSc) whether skin affection did not exceed proximally this limit and sine scleroderma systemic sclerosis (ssSSc) if no skin thickening was presented [17]. The disease onset was described as the date of first symptom attributable to SSc including Raynaud's phenomenon (RP) as well as analysing the time from the first symptom of SSc excluding RP. All clinical or parameter data were collected at time of RHC.

The presence of telangiectasias, past or current digital ulcers (DU) and past history of scleroderma renal crisis (SRC) were recorded. ILD was defined as radiological evidence of interstitial disease on HRCT. Cardiac involvement was defined as current or past history of pericardial effusion, left ventricular ejection fraction (LVEF) lower than 50%, ischemic heart disease with no cardiovascular risk factor or conduction abnormalities.

Antinuclear antibodies (ANA) were evaluated by indirect immunofluorescence (IIF) assay using HEp-cell line 2. Anticentromere antibodies (ACA) were described by IIF or commercial line blot assay to centromere proteins A and B (EUROLINE Systemic Sclerosis (Nucleoli) Profile (IgG), Euroimmun, Germany). Anti-topoisomerase I antibodies were determined by enzyme-linked immunosorbent assay.

Demographics, cardiovascular risk factors, anthropometrical data, six-minute walk distance, complete pulmonary function test (PFT), 6-minute walking distance (6MWD),

WHO-functional class, laboratory data including serum urate, NT-proBNP and right axis deviation in electrocardiography (ECG) were registered. Echocardiography included the determination of left ventricular ejection fraction (LVEF), right atrium (RA) area, tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE), tricuspid regurgitation velocity (TRV) and RVSP.

RHC details consisted of mPAP, PAWP, right atrial pressure (RAP), transpulmonary pressure gradient (TPG), cardiac output (CO), pulmonary vascular resistance (PVR), systemic vascular resistance (SVR), mixed venous oxygen saturation (SvO₂) measured in pulmonary artery and arterial oxygen saturation (SaO₂) measured in arterial blood gases analysis.

The application of DETECT algorithm was conducted in two steps through the website PAH risk calculator (<http://detect-pah.com>) [18], the first step for referring the patient to the echocardiography and the second for carrying out the RHC [12]. The indication of RHC following ESC/ERS 2009 guidelines was considered if 1) TRV > 3.4 m/s; or 2) TRV > 2.8 - ≤ 3.4 m/s with symptoms (undue dyspnoea or fatigue, chest pain, near syncope or signs of right heart failure); or 3) TRV ≤ 2.8 m/s with symptoms and additional echocardiographic variables suggestive of PH.

Statistical Analysis

Qualitative data were expressed as mean and standard deviation (SD) after approving the normal distribution test and non-normal qualitative variables were described as median and interquartile range (IQR). To assess whether there were statistically significant differences, t-Student test or Mann-Whitney U test were used according to normal distribution test. Categorical variables were analysed by chi-square test and the

Fisher's exact tests. For sensitivity, specificity, PPV and NPV 95% confidence intervals (CIs) were calculated. A *p*-value <0.05 was considered as significant. Statistical analysis was conducted with SPSS 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL)

RESULTS

Baseline characteristics

Comparing the indications of the RHC in 83 patients, the proportions of patients diagnosed with PH were 24/35 (68.5%) in the group of patients with RVSP > 36 mmHg plus FVC/DLCO ratio > 1.6, whereas 23/34 (67.6%) of patients with RVSP > 36 mmHg, 4/8 (50.0%) of patients with FVC/DLCO ratio > 1.6, and 1/6 (16.6%) in patients with progressive unexplained dyspnoea. Two out of four excluded patients had PH due to ILD. Following the RHC results in the 78 patients who fulfilled inclusion and did not met exclusion criteria, PH was identified in 50 (64.1%) patients and in the other 28 (35.8%) subjects it was ruled out, although 14 of them had BoPAP with a mPAP between 21 and 24 mmHg (figure 1). According to PH classification, 35 (44.8%) patients were diagnosed with PAH, 6 (7.6%) had PH associated to left heart disease and 9 (11.5%) showed PH-interstitial lung disease. Sixty-three PAH and non-PH patients were selected for DETECT algorithm analysis.

Figure 1 Flow chart of patients in the study population. Eighty-three SSc patients had at least one RHC which was revised retrospectively. Four patients were excluded for presenting exclusion criteria (all patients had FVC lower than 40%), and another for not meeting inclusion criteria who showed a DLCO equal or higher than 60%. PAH and non-PH patients ($n = 63$) were selected for the following studies 1) validation of DETECT algorithm as screening of PAH and 2) identification of patients with mPAP ≥ 21 mmHg. All patients ($n = 83$) were included for the study 3) determination of any group of PH.

FVC, forced vital capacity; DLCO, diffusing capacity for carbon monoxide; RHC, right heart catheterization; PAH, pulmonary arterial hypertension; PH, pulmonary hypertension; mPAP, mean pulmonary artery pressure; WHO, World Health Organization; PAWP, pulmonary artery wedge pressure; LHD, left heart disease; ILD, interstitial lung disease.

The baseline characteristics of selected SSc patients are summarized in Table 1. There were 59 women and 4 men in both groups. The mean \pm SD age at RHC was 62.4 ± 11.6 years old. Based on skin involvement, lcSSc was the most frequent cutaneous subtype in 45 (71.4%) patients, 10 (15.9%) subjects were dcSSc, and 8 (12.7%) were ssSSc. The mean time from the first SSc symptom including RP was 18.6 ± 12.3 years, while for the time from first non-RP it was 10.5 ± 8.9 years. Almost the whole study population 61 (96.8%) fulfilled ACR/EULAR 2013 classification criteria. There were no statistical differences in the presence of telangiectasias, past or current DU, history of SRC, ILD or cardiac involvement, when comparing both groups. Although there were no statistical differences in positivity to antinuclear antibodies or the observation of a nucleolar pattern in the indirect immunofluorescence, PAH patients had more often ACA ($n= 23$, 65.7% *vs* $n= 11$, 39.3%, $P = 0.03$), but lower positivity against anti-topoisomerase I antibodies ($n= 3$, 8.6% *vs* $n= 9$, 32.1%, $P = 0.01$). Concerning the cardiovascular risk factors in the whole group, arterial hypertension was the most frequent in 27 (42.9%) of patients, followed by dyslipidaemia in 15 (23.8%) although no patient was diabetic. No statistical differences were found in anthropometrical variables. The patients with PAH received lower immunosuppressant therapy than the control group, and lower treatment with calcium channel blockers. However, there were no statistical differences in the use of specific vasodilator therapy, whose indication was the RP in all cases.

Table 1 Demographic data and baseline characteristics

	All patients (n = 63)	PAH patients (n = 35)	Non-PH patients (n = 28)	P-value
Female^a	59 (93.7)	34 (97.1)	25 (89.3)	0.31
Age, years^b	62.4 (±11.6)	64.4 (±10.8)	59.9 (±12.4)	0.13
DcSSc^a	10 (15.9)	4 (11.4)	6 (21.4)	0.31
Time from first symptom, years^b	18.6 (±12.3)	19.6 (±11.2)	17.2 (±13.7)	0.29
Time from first non-RP symptom, years^b	10.5 (±8.9)	9.7 (±9.4)	11.5 (±8.2)	0.21
ACR/EULAR 2013 classification criteria^a	61 (96.8)	34 (97.1)	27 (96.4)	1.0
Telangiectasias^a	59 (93.7)	33 (94.3)	26 (92.9)	1.0
Digital ulcers^a	35 (55.6)	20 (57.1)	15 (53.6)	0.77
Scleroderma renal crisis^a	2 (3.2)	2 (5.7)	0 (0)	0.49
Interstitial lung disease^a	32 (50.8)	19 (54.3)	12 (42.9)	0.45
Cardiac involvement^a	26 (41.3)	17 (48.6)	9 (32.1)	0.18
Antinuclear antibodies^a	62 (98.4)	34 (97.1)	28 (100)	1.0
ACA ^a	34 (54.0)	23 (65.7)	11 (39.3)	0.03
Anti-Scl-70 ^a	12 (19.0)	3 (8.6)	9 (32.1)	0.01
Nucleolar IIF pattern ^a	4 (6.3)	3 (8.6)	1 (3.6)	0.62
Arterial hypertension^a	27 (42.9)	14 (40)	13 (43.4)	0.60
Dyslipidaemia^a	15 (23.8)	6 (17.1)	9 (32.1)	0.16
Diabetes mellitus^a	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
Immunosuppressant therapy^a	25 (39.7)	8 (22.9)	17 (60.7)	<0.01
Prednisone ^a	19 (30.2)	7 (20.0)	12 (40.9)	0.04
Sodium mycophenolate ^a	7 (11.1)	1 (2.9)	6 (21.4)	0.03
Azathioprine	3 (4.8)	0 (0)	3 (10.7)	0.08
IV Cyclophosphamide ^a	12 (19.0)	3 (8.6)	9 (32.1)	0.01
Calcium channel blocker^a	33 (52.4)	14 (40.0)	19 (67.9)	0.02
Specific vasodilator therapy^a	13 (20.6)	7 (20.0)	6 (21.4)	0.88
IV Prostanoids ^a	1 (1.6)	1 (2.9)	0 (0)	1.0
ERA ^a	10 (15.9)	5 (14.3)	5 (17.9)	0.74
PDE5 I ^a	5 (7.9)	2 (5.7)	3 (10.7)	0.64

^aData are shown as number (%) for categorical variables.^bData are shown as mean (± standard deviation, SD)

PAH, pulmonary arterial hypertension; PH, pulmonary hypertension; dcSSc, diffuse cutaneous systemic sclerosis;

RP, Raynaud's phenomenon; ACA, anticentromere antibodies; IIF, indirect immunofluorescence; NA, not applicable; IV: intravenous; ERA: endothelin receptor antagonist; PDE5 I: phosphodiesterase type-5 inhibitor.

Regarding respiratory parameters, PAH group showed higher FVC % predicted/ DLCO % predicted than controls ($2.0 \pm 0.7\%$ vs $1.5 \pm 0.4\%$, $P < 0.01$) and shorter 6MWD (232.8 ± 76.7 metres vs 322.4 ± 105.0 metres, $P = 0.01$) (table 2). Advanced WHO functional classes III/IV were more common in 15 (42.9%) patients with PAH, while the non-PH group had 2 (7.1%) patients ($P < 0.01$). In the PAH group higher N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) and serum urate levels, as well as higher prevalence of right axis deviation in ECG was found. In relation to echocardiographic data, PAH patients had greater RA area, moreover they presented higher TRV and RVSP than non-PH patients. Therefore, there were statistically significant differences between PAH and non-PH patients in seven out of eight variables considered in DETECT algorithm.

Table 2 Respiratory, laboratory and echocardiography parameters.

	All patients (n = 63)	PAH patients (n = 35)	Non-PH patients (n = 28)	P-value
Pulmonary function tests				
FVC, % predicted^b	75.2 (± 16.4)	75.6 (± 15.5)	74.7 (± 17.8)	0.86
DLCO, % predicted^b	46.3 (± 14.2)	41.5 (± 13.9)	51.0 (± 13.1)	0.01
FVC%/DLCO %^b	1.8 (± 0.6)	2.0 (± 0.7)	1.5 (± 0.4)	<0.01
6MWD, metres^b	256.5 (± 92.5)	232.8 (± 76.7)	322.4 (± 105.0)	0.01
WHO functional class III/IV^a	17 (27.0)	15 (42.9)	2 (7.1)	<0.01
Laboratory				
NT-proBNP, pg/mL^c	198 (41 to 647)	1271(580 to 3154)	87 (32 to 202)	<0.001
Serum urate, mg/dL^b	5.6 (± 1.9)	6.8 (± 1.9)	4.6 (± 1.0)	<0.001
Right axis in ECG^a	18 (28.6)	10 (28.6)	1 (3.6)	0.01
Echocardiography				
LVEF, %^c	60.0 (59.0 to 65.0)	60.0 (58.5 to 65.0)	62.0 (59.7 to 65.0)	0.43
TAPSE, mm^b	19.4 (± 3.9)	19.1 (± 4.6)	19.8 (± 3.0)	0.55
RA area, cm²^c	16.0 (13.0 to 21.0)	17.0 (15.0 to 22.7)	14.0 (12.0 to 16.0)	<0.01
TRV, m/s^b	3.5 (± 0.7)	4.0 (± 0.6)	2.8 (± 0.3)	<0.001

RVSP, mmHg^c	59.5 (44.0 to 76.2)	73.0 (61.0 to 85.0)	44.0 (37.0 to 51.0)	<0.001
-------------------------------	---------------------	---------------------	---------------------	--------

^aData are shown as number (%) for categorical variables.

^bData are shown as mean (\pm standard deviation, SD)

^cData are shown as median (interquartile range, IQR)

PAH, pulmonary arterial hypertension; PH, pulmonary hypertension; FVC, forced vital capacity; DLCO, diffusing capacity for carbon monoxide; 6MWD, 6- minute walking distance; WHO, World Health Organization; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; ECG, electrocardiography; LVEF, left ventricular ejection fraction; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion; RA, right atrium; TRV, tricuspid regurgitant velocity; RVSP, right ventricular systolic pressure.

RHC in the PAH group was characterized by superior mean PAP (table 3). Specifically, the median (IQR) of mPAP was 42.0 (33.0 to 50.0) mmHg in PAH patients, while it was 20.5 (17.0 to 23.0) mmHg in control group ($P < 0.001$). Furthermore, TPG was increased in the first study group, but CO was lower in those patients. The PAH group compared with the non-PH patients showed higher pulmonary vascular resistance with lower SvO₂ and SaO₂ during the RHC.

Table 3 Haemodynamic characteristics on right heart catheterization.

	All patients <i>(n = 63)</i>	PAH patients <i>(n = 35)</i>	Non-PH patients <i>(n = 28)</i>	P-value
Mean PAP, mmHg^b	31.0 (21.0 to 44.0)	42.0 (33.0 to 50.0)	20.5 (17.0 to 23.0)	<0.001
PAWP, mmHg^a	9.6 (\pm 4.0)	9.7 (\pm 4.8)	9.5 (\pm 3.4)	0.90
RAP, mmHg^b	5.0 (2.5 to 8.5)	5.0 (3.0 to 10.0)	4.5 (2.0 to 7.0)	0.14
TPG, mmHg^a	20.0 (\pm 13.4)	31.4 (\pm 11.8)	10.6 (\pm 3.9)	<0.001
Cardiac output, L/min^b	3.55 (2.92 to 4.58)	3.4 (2.83 to 4.01)	3.9 (2.94 to 5.16)	0.05
PVR, WU^a	6.6 (\pm 4.8)	9.9 (\pm 4.6)	3.2 (\pm 1.6)	<0.001
SVR, WU^a	26.9 (\pm 10.3)	28.6 (\pm 9.7)	25.2 (\pm 11.0)	0.42
SvO₂, %^a	66.3 (\pm 8.1)	61.8 (\pm 8.3)	71.0 (\pm 4.7)	<0.001
SaO₂, %^a	93.5 (\pm 4.0)	91.2 (\pm 3.7)	96.1 (\pm 2.5)	<0.001

^aData are shown as mean (\pm standard deviation, SD)

^bData are shown as median (interquartile range, IQR)

PAH, pulmonary arterial hypertension; PH, pulmonary hypertension; PAP, pulmonary artery pressure; PAWP, pulmonary artery wedge pressure; RAP, right atrial pressure; TPG, transpulmonary pressure gradient; PVR, pulmonary vascular resistance; WU, Wood units; SVR, systemic vascular resistance; SvO_2 , mixed venous oxygen saturation; SaO_2 , arterial oxygen saturation.

Comparisons of DETECT algorithm and ESC/ERS 2009 guidelines

DETECT algorithm steps are represented in Table 4. After step 1 of the algorithm 35 (100%) patients in PAH group would have been referred to echocardiography compared to 24 (85.7%) in the control group ($P = 0.03$). Following echocardiography results, RHC would have been recommended in all patients 35 (100%) from the PAH group while this was only the case in 16 (57.1%) non-PH subjects ($P < 0.001$). However, attending ESC/ERS 2009 guidelines 32 (91.4%) PAH patients and 4 (14.3%) non-PH patients would have been submitted to RHC. RHC referral ratio was higher in DETECT than ESC/ERS guidelines. The main causes of not sending these patients to RHC using ESC/ERS 2009 guidelines would have been that 12 patients had $TRV > 2.8 - \leq 3.4$ m/s but with no symptoms, 5 patients presented $TRV \leq 2.8$ m/s with symptoms but with no additional echocardiographic sign of PH, and another 10 patients showed $TRV \leq 2.8$ m/s with no symptoms nor additional echocardiographic signs of PH. There would have been no missed diagnosis of PAH with DETECT although using ESC/ERS guidelines it would have reached 8.5% (table 5). The sensitivity (95% CI) of DETECT algorithm was 100% (90.1 – 100) compared to 91.4% (77.6 – 97.0) of ESC/ERS 2009 guidelines. The specificity was lower in DETECT 42.9% (26.5 – 60.9) whereas it was 85.7% (68.2 – 94.3) in the latter guidelines. No statistical differences were found in PPV 68.6% (55.0 – 79.7) in the former algorithm compared to 88.9% (74.7 – 95.6) in the second

method. However, NPV reached 100% (75.7 – 100) in DETECT algorithm while in the ESC/ERS 2009 guidelines it was 88.9% (71.9 – 96.1).

As a strategy to identify mPAP ≥ 21 mmHg (both BoPAP and PAH), the DETECT had superior sensitivity 93.9% (83.5 – 97.9) and NPV 75.0% (46.8 – 91.1) to ESC/ERS guidelines with 69.4% (55.5 – 80.5) and 44.4% (27.6 – 62.7), respectively. Furthermore, DETECT had 6.1% of missed mPAP ≥ 21 diagnosis whereas these were increased to 30.6% with ESC/ERS 2009 guidelines. In fact, analysing only BoPAP patients, there were 3 out of 14 (21.1%) missed diagnosis in DETECT whereas it reached 12 out of 14 (85.7%) using the second protocol. However, specificity and PPV were slightly lower using the first screening method 64.3% and 90.2% compared to 85.7% and 94.4% in the ESC/ERS guidelines, respectively.

To investigate the capacity of detection of any sort of PH, the whole cohort of patients ($n = 83$) with a first RHC were studied, regardless of meeting DETECT inclusion or exclusion criteria. There was 1.9% of missed PH diagnosis using DETECT algorithm compared with 19.2% in ESC/ERS 2009 guidelines. Moreover, sensitivity and NPV were greater using the first screening method, 98.1% and 93.3%, compared with 80.8% and 73.0% in the ESC/ERS guidelines. Nevertheless, specificity and PPV were again slightly inferior applying DETECT algorithm, 45.2% and 75.0%, whereas those were 87.1% and 91.3% respectively in the other method studied.

Table 4 Comparisons of DETECT algorithm and ESC/ERS 2009 guidelines.

	PAH vs Non-PH patients (n = 63)			mPAP ≥21 vs mPAP <21mmHg patients (n = 63)			PH vs Non-PH patients (n = 83)		
	PAH (n = 35)	Non-PH (n = 28)	P-value	mPAP ≥21mmHg (n = 49)	mPAP <21mmHg (n = 14)	P-value	PH (n = 52)	Non-PH (n = 31)	P-value
DETECT algorithm									
Score step 1^b	330.0 (±25.3)	313.7 (±17.5)	<0.01	326.9 (±22.8)	308.6 (±20.8)	<0.01	327.9 (±23.6)	311.8 (±17.6)	<0.01
Indication of Echo^a	35 (100)	24 (85.7)	0.03	49 (100)	10 (71.4)	<0.01	51 (98.1)	24 (77.4)	<0.01
Score step 2^b	60.2 (±11.3)	37.3 (±8.4)	<0.001	54.7 (±13.3)	33.5 (±8.8)	<0.001	56.4 (±12.4)	36.5 (±8.4)	<0.001
RHC recommendation^a	35 (100)	16 (57.1)	<0.001	46 (93.9)	5 (35.7)	<0.001	51 (98.1)	17 (54.8)	<0.001
ESC/ERS 2009 guidelines									
RHC recommendation^a	32 (91.4)	4 (14.3)	<0.001	34 (69.4)	2 (14.3)	<0.001	42 (80.8)	4 (12.9)	<0.001

^aData are shown as number (%) for categorical variables.

^bData are shown as mean (± standard deviation, SD)

PAH, pulmonary arterial hypertension; PH, pulmonary hypertension; mPAP, mean pulmonary artery pressure; RHC, right heart catheterization; ESC/ERS, European Society of Cardiology and the European Respiratory Society.

Table 5 Observation of PAH detection programs.

		RHC referral rate, %	Missed diagnoses, %	Sensitivity %	Specificity %	PPV %	NPV %
mPAP \geq 21 vs PAH vs Non- PH patients	DETECT algorithm (95 % CI)	51/63, 80.9% -	0/35, 0% -	100% (90.1 – 100)	42.9% (26.5 – 60.9)	68.6% (55.0 – 79.7)	100% (75.7 – 100)
	ESC/ERS guidelines (95 % CI)	36/63, 57.1% -	3/35, 8.5% -	91.4% (77.6 – 97.0)	85.7% (68.5 – 94.3)	88.9% (74.7 – 95.6)	88.9% (71.9 – 96.1)
	DETECT algorithm (95 % CI)	51/63, 80.9% -	3/49, 6.1% -	93.9% (83.5 – 97.9)	64.3% (38.8 – 83.7)	90.2% (79.0 – 95.7)	75.0% (46.8 – 91.1)
	ESC/ERS guidelines (95 % CI)	36/63, 57.1% -	15/49, 30.6% -	69.4% (55.5 – 80.5)	85.7% (60.1 – 96.0)	94.4% (81.9 – 98.5)	44.4% (27.6 – 62.7)
	DETECT algorithm (95 % CI)	68/83, 81.9% -	1/52, 1.9% -	98.1% (89.9 – 99.7)	45.2% (29.2 – 62.2)	75.0% (63.6 – 83.8)	93.3% (70.2 – 98.8)
	ESC/ERS guidelines (95 % CI)	46/83, 55.4% -	10/52, 19.2% -	80.8% (68.1 – 89.2)	87.1% (71.1 – 94.9)	91.3% (79.7 – 96.6)	73.0% (57.0 – 84.6)

Data shown as number (%).

RHC, right heart catheterization; PPV, positive predictive value; NPV, negative positive value; PAH, pulmonary arterial hypertension; PH, pulmonary hypertension; CI, confidence interval; mPAP, mean pulmonary artery pressure; ESC/ERS, European Society of Cardiology and the European Respiratory Society.

DISCUSSION

The present retrospective study compares the application of DETECT algorithm with the ESC/ERS 2009 guidelines in patients with PAH and non-PH subjects who had undergone a RHC. DETECT program achieved the greater sensitivity, in all patients suffering from PAH the RHC would have been recommended, and also superior negative predictive value than ESC/ERS guidelines. Nevertheless, ESC/ERS 2009 guidelines presented higher specificity and positive predictive value than DETECT algorithm. Furthermore, DETECT algorithm showed higher sensitivity and NPV percentages both for the detection of mPAP ≥ 21 patients and any group of PH, although with lower specificity and PPV.

For the application of DETECT algorithm it is necessary to meet inclusion criteria, presenting a duration of SSc greater than 3 years from the first non-RP symptom and a DLCO lower than 60% predicted. This was to increase the specificity of the screening method, due to the fact that less than 10% of a cohort of 243 SSc-PH patients presented DLCO $> 60\%$ [19]. Furthermore, patients could not fulfil exclusion criteria such as previous PH diagnosed by RHC, a forced vital capacity (FVC) lower than 40% or a left heart disease involvement [12]. Nevertheless, DETECT does not establish the periodicity of an assessment by this method, has not been evaluated during a monitoring period of a cohort of patients, and has not explored the ability to predict mPAP ≥ 21 mmHg or any type of PH. As a consequence of this work, the new ESC/ESR 2015 guidelines were recently published, which strengthen the recommendation of annual screening of PH in the set of patients with SSc and introduce the DETECT algorithm as a valid method to be performed in this group of patients based on the demonstrated evidence [15].

Compared to Coghlan *et al.* paper, patients in our cohort had surprisingly higher prevalence of telangiectasias and ACA antibodies. Almost 60% of PAH subjects presented

WHO functional class I or II and mild reduced 6MWD comparable to detection cohorts of previous studies focused on an early PAH diagnosis [10, 12]. This fact seems to reflect that patients in our study were referred promptly to RHC as a result of an active and early suspicion of PAH during monitoring. In the present paper we describe similar sensitivity, specificity and NPV values, although with higher RHC referral ratio and PPV using the DETECT algorithm than the original work. However, regarding the application of ESC/ERS 2009 guidelines we report higher sensitivity, specificity and PPV values as well as a higher RHC referral ratio than Coghlan *et al.* This may be explained due to the fact the main indication of performing the RHC in our study was the presence of an abnormal echocardiographic result suggesting the presence of PAH. Furthermore, the high RHC referral ratio may be justified because the study was conducted in a selected population of patients at high risk of PAH based on clinical, pulmonary function test and echocardiographic parameters.

Few groups have published the application of DETECT algorithm, Hao *et al.* analysed the previous protocol in patients from the multicentre Australian Scleroderma Cohort Study (ASCS) along with the Australian Scleroderma Interest Group (ASIG) algorithm and ESC/ERS 2009 guidelines [20, 21]. Authors found a higher sensitivity and NPV using DETECT or ASIG algorithm than with ESC/ERS guidelines, which we can confirm in our study. Surprisingly, ASIG protocol had superior specificity than DETECT or even ESC/ERS guidelines, which contrasts with 48% and 69% respectively previously published [12]. Authors described that nine patients did not meet DLCO < 60% or disease duration criteria, which may have justified the lower specificity found in DETECT algorithm [21]. Furthermore, DETECT and ASIG screening methods had the highest sensitivity and specificity to identify both precapillary PH and any group of PH, results that we corroborate in our work. In the present work the ASIG program was not analysed

due to the fact this method is not based in on evidence and has not been well validated in European cohorts.

Recently, a Czech scleroderma group designed a modified DETECT algorithm through the use of a right ventricular outflow tract instead of RA area [22]. Using this modified DETECT program authors calculated a RHC referral ratio of 41.4% while it was 24.1% with ESC/ERS guidelines. Interestingly, although only 11/58 (18.9%) patients had undergone RHC, in patients who were recommended by modified DETECT there were also other PH groups diagnosed, such as PH associated to left heart disease and PH related to ILD. Therefore, this article suggested that DETECT algorithm would be useful to recommend RHC for diagnosing other PH groups according to WHO classification.

Although there are some discrepancies on the prognostic role of BoPAP, it has been recently published a study evidencing a higher risk of mortality and hospitalization in US veteran patients with BoPAP (defined as 19-24 mmHg) [23]. Consequently, the study highlighted the relevance of diagnosing BoPAP in selected groups of patients such as scleroderma. In a post-hoc analysis of DETECT study, authors demonstrated that BoPAP patients had a higher FVC/DLCO rate, TRV and NT-proBNP levels higher than normal mPAP patients [16]. Although the paper did not evaluate the application of DETECT in both groups of patients, it would support the increase of the specificity of this program found in our work studying patients with mPAP ≥ 21 versus mPAP < 21 mmHg compared to the PAH versus non-PH strategy. In the set of SSc patients, finding a BoPAP in the first RHC was demonstrated as a high risk factor to develop PH with a hazard ratio (HR) of 3.7 during follow-up compared to patients with mPAP < 21 mmHg [24]. In this line, the Pulmonary Hypertension Assessment and Recognition of Outcomes in Scleroderma (PHAROS) study group as a multicenter prospective SSc cohort described that 55% of

BoPAP patients progressed to PH, whereas in the group of mPAP <21mmHg this was 32% during a mean of 25.7 months of monitoring [25]. Having established the relevance of identifying SSc patients with BoPAP for close supervision, this is the first paper which demonstrates the accuracy of DETECT algorithm in the identification of mPAP ≥ 21 patients.

The main limitation of the present study was the retrospective design. RHC was not performed in the whole cohort of SSc patients, therefore some mild forms of PAH may be undiagnosed. In the same line, although the periodicity of the performing of screening methods is not well established, these were not carried out in the whole cohort which may not reflect the real referral rate to RHC.

CONCLUSIONS

Pulmonary arterial hypertension is one of the leading causes of death in SSc patients, and its early diagnosis has demonstrated increased survival rates. The present study supports the DETECT algorithm as an excellent screening method due to its high sensitivity and negative predictive value, which minimizes the number of missed diagnoses of previous recommendations. Furthermore, our data suggest the DETECT algorithm is also accurate either for an early diagnosis of borderline mPAP who are at highest risk to develop PAH or the diagnosis of any group of PH.

LIST OF ABBREVIATIONS

ACA: anticentromere antibodies; ANA: antinuclear antibodies; ASCS: Australian Scleroderma Cohort Study; ASIG: Australian Scleroderma Interest Group; BoPAP: borderline mPAP; CI: confidence interval; CO: cardiac output; dcSSc: diffuse cutaneous SSc; DLCO: diffusing capacity for carbon monoxide; DU: digital ulcers; ECG:

electrocardiography; ERA: endothelin receptor antagonist; ESC/ERS: European Society of Cardiology and the European Respiratory Society; FVC: forced vital capacity; HR: hazard ratio; HRCT: high resolution computed tomography; IIF: indirect immunofluorescence; ILD: interstitial lung disease; IQR: interquartile range; IV: intravenous; lcSSc: limited cutaneous SSc; LHD: left heart disease; LVEF: left ventricular ejection fraction; mPAP: median pulmonary arterial pressure; NPV: negative predictive value; NT-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide; PAH: pulmonary arterial hypertension; PAWP: pulmonary artery wedge pressure; PDE5 I: phosphodiesterase type-5 inhibitor; PFT: pulmonary function test; PH: pulmonary hypertension; PHAROS: Pulmonary Hypertension Assessment and Recognition of Outcomes in Scleroderma; PPV: positive predictive value; PVR: pulmonary vascular resistance; RA: right atrium; RAP: right atrial pressure; RHC: right heart catheterization; RP: Raynaud's phenomenon; RVSP: right ventricular systolic pressure; SaO₂: arterial oxygen saturation; SD: standard deviation; SRC: scleroderma renal crisis; SvO₂: mixed venous oxygen saturation; SVR: systemic vascular resistance; SSc: systemic sclerosis; ssSSc: sine scleroderma systemic sclerosis; TAPSE: tricuspid annular plane systolic excursion; TPG: transpulmonary pressure gradient; TRV: tricuspid regurgitant velocity; vs: versus; WHO: World Health Organization; WU, Wood units; 6MWD: 6-minute walking distance.

DECLARATIONS

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethics Committee for Clinical Research of the hospital and all subjects consented to use of their clinical and laboratory data.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was funded by Instituto de Salud Carlos III, grant PI16/02088 cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF). This work was supported by an educational unrestricted scholarship granted by Actelion Pharmaceuticals.

AGDC was supported by the Contratos Predoctorales de Formación en Investigación (PFIS) grant from Instituto de Salud Carlos III [FI14/00643].

Authors' contributions

AGDC made substantial contributions to study conception and design, as well as acquisition, analysis and interpretation of data, drafting the article, and approval of the final manuscript. ELCM and GG made substantial contributions to study conception and design, analysis and interpretation of data, revising the manuscript critically for important intellectual content and approval of the final manuscript. JFRP, AR, CB, MLM, ED and VFP made substantial contributions to study conception and design, revising the manuscript critically for important intellectual content, and approval of the final manuscript. CPSA made substantial contributions to study conception and design, interpretation of data, revising the manuscript critically for important intellectual content

and approval of the final manuscript. AGDC and ELCM had full access to all of the data in the study and they both take responsibility for the integrity and accuracy of the data. Funders had no access to the data, were not involved in study design, acquisition, analysis and interpretation of data or writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the patients for their participation.

Authors' information

¹Department of Systemic Autoimmune Diseases, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Department of Cardiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

³Department of Pneumology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

REFERENCES

1. Denton CP, Ong VH. Targeted therapies for systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9:451-64.
2. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15002.
3. Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, Davar J, et al. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:1088-93.

4. Avouac J, Airo P, Meune C, Beretta L, Dieude P, Caramaschi P, et al. Prevalence of pulmonary hypertension in systemic sclerosis in European Caucasians and metaanalysis of 5 studies. *J Rheumatol*. 2010;37:2290-8.
5. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:940-4.
6. Nihtyanova SI, Schreiber BE, Ong VH, Rosenberg D, Moinzadeh P, Coghlan JG, et al. Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:1625-35.
7. Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Campillo-Grau M, Ramos-Casals M, et al. Registry of the Spanish Network for Systemic Sclerosis: Survival, Prognostic Factors, and Causes of Death. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e1728.
8. Rubenfire M, Huffman MD, Krishnan S, Seibold JR, Schiopu E, McLaughlin VV. Survival in systemic sclerosis with pulmonary arterial hypertension has not improved in the modern era. *Chest*. 2013;144:1282-90.
9. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, et al. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3792-800.
10. Humbert M, Yaici A, de Groote P, Montani D, Sitbon O, Launay D, et al. Screening for pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis: clinical characteristics at diagnosis and long-term survival. *Arthritis Rheum*. 2011;63:3522-30.
11. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the 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 the

- International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Eur Heart J. 2009;30:2493-537.
12. Coghlan JG, Denton CP, Grunig E, Bonderman D, Distler O, Khanna D, et al. Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. Ann Rheum Dis. 2014;73:1340-9.
13. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol. 1988;15:202-5.
14. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. 2013;65:2737-47.
15. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, 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.
16. Visovatti SH, Distler O, Coghlan JG, Denton CP, Grunig E, Bonderman D, et al. Borderline pulmonary arterial pressure in systemic sclerosis patients: a post-hoc analysis of the DETECT study. Arthritis Res Ther. 2014;16:493.
17. Simeon-Aznar CP, Tolosa-Vilella C, Gabarro-Julia L, Campillo-Grau M, Guillen Del Castillo A, Fonollosa-Pla V, et al. Systemic sclerosis sine scleroderma and limited cutaneous systemic sclerosis: similarities and differences. Clin Exp Rheumatol. 2014;32:S-33-40.

18. DETECT - DETECTion of PAH in SSC. <http://detect-pah.com>. Accessed 25 Apr 2016.
19. Schwaiger JP, Khanna D, Gerry Coghlan J. Screening patients with scleroderma for pulmonary arterial hypertension and implications for other at-risk populations. *Eur Respir Rev*. 2013;22:515-25.
20. Thakkar V, Stevens W, Prior D, Youssef P, Liew D, Gabbay E, et al. The inclusion of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in a sensitive screening strategy for systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension: a cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2013;15:R193.
21. Hao Y, Thakkar V, Stevens W, Morrisroe K, Prior D, Rabusa C, et al. A comparison of the predictive accuracy of three screening models for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:7.
22. Soukup T, Pudil R, Kubinova K, Hromadkova L, Dusek J, Tosovsky M, et al. Application of the DETECT algorithm for detection of risk of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: data from a Czech tertiary centre. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55:109-14.
23. Maron BA, Hess E, Maddox TM, Opotowsky AR, Tedford RJ, Lahm T, et al. Association of Borderline Pulmonary Hypertension With Mortality and Hospitalization in a Large Patient Cohort: Insights From the Veterans Affairs Clinical Assessment, Reporting, and Tracking Program. *Circulation*. 2016;133:1240-8.
24. Valerio CJ, Schreiber BE, Handler CE, Denton CP, Coghlan JG. Borderline mean pulmonary artery pressure in patients with systemic sclerosis: transpulmonary gradient predicts risk of developing pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum*. 2013;65:1074-84.
25. Bae S, Saggar R, Bolster MB, Chung L, Csuka ME, Derk C, et al. Baseline characteristics and follow-up in patients with normal haemodynamics versus

borderline mean pulmonary arterial pressure in systemic sclerosis: results from the PHAROS registry. Ann Rheum Dis. 2012;71:1335-42.

FIGURES

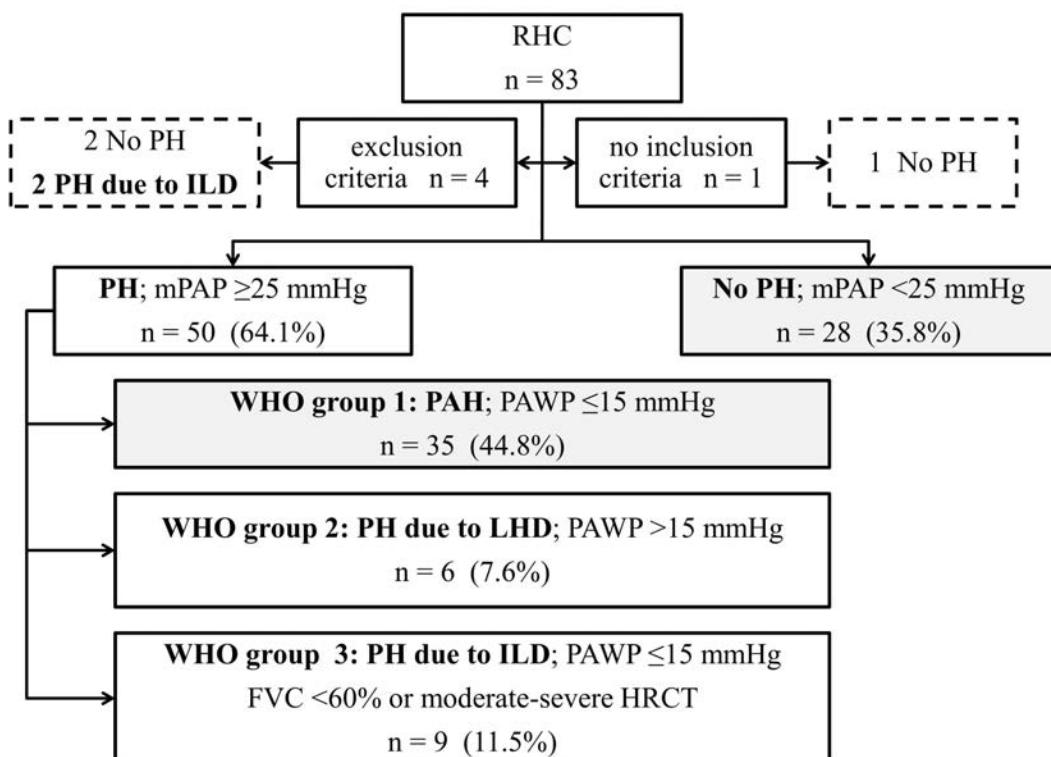


Figure 1 Flow chart of patients in the study population. Eighty-three SSc patients had at least one RHC which was revised retrospectively. Four patients were excluded for presenting exclusion criteria (all patients had FVC lower than 40%), and another for not meeting inclusion criteria who showed a DLCO equal or higher than 60%. PAH and non-PH patients ($n = 63$) were selected for the following studies 1) validation of DETECT algorithm as screening of PAH and 2) identification of patients with $mPAP \geq 21$ mmHg. All patients ($n = 83$) were included for the study 3) determination of any group of PH. FVC, forced vital capacity; DLCO, diffusing capacity for carbon monoxide; RHC, right heart catheterization; PAH, pulmonary arterial hypertension; PH, pulmonary hypertension;

mPAP, mean pulmonary artery pressure; WHO, World Health Organization; PAWP, pulmonary artery wedge pressure; LHD, left heart disease; ILD, interstitial lung disease.

9. DISCUSIÓN GENERAL

En los trabajos sobre EPI asociada a la ES se observó que la evolución de dicha afección orgánica difería según el anticuerpo presentado. Los pacientes con anticuerpos anti-PM/Scl mostraron una estabilidad de la FVC durante el período de seguimiento, incluso un tercio de ellos tenían una mejora superior al 10% en la FVC durante la evolución, presentaron mejor SLP y supervivencia libre de enfermedad restrictiva grave. Por otro lado, en el estudio de biomarcadores de vía aérea obtenidos por métodos no invasivos, los niveles bajos de pH en el CAE o de FeNO se relacionaron con una peor SLP a 4 años de seguimiento. En los pacientes con EPI, valores aumentos de CO exhalado fueron asociados a menores FVC de forma basal y a los 4 años de seguimiento, aunque sin presentar un valor pronóstico.

En el trabajo sobre el diagnóstico precoz de HP, se comparó de forma retrospectiva el algoritmo DETECT frente a las recomendaciones de las guías de la ESC/ERS del 2009, seleccionando los pacientes con HAP y los que no presentaban HP que habían sido sometidos a un CCD. El algoritmo DETECT alcanzó una mayor sensibilidad y VPN respecto a las guías de la ESC/ERS del 2009, las cuales destacaban por una mayor especificidad y VPP. El algoritmo DETECT paralelamente demostró mayor sensibilidad y VPN tanto para la detección de los pacientes con PAPs ≥ 21 mmHg (incluyendo HP limítrofe y HAP), como para la detección de cualquier grupo de HP, aunque con menor especificidad y VPP en comparación con las guías de la ESC/ERS del 2009.

Valor pronóstico de los anticuerpos anti-PM/Scl en los pacientes con EPI-ES

Artículo 1: Guillen-Del Castillo A, Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Alonso-Vila S, Reverte-Vinaixa MM, Muñoz X, Pallisa E, Selva-O'Callaghan A, Fernández-Codina A, Vilardell-Tarrés M. Good outcome of interstitial lung disease in patients with scleroderma associated to anti-PM/Scl antibody. *Semin Arthritis Rheum.* 2014;44:331-7.

La edad de inicio de la ES fue similar a la descrita previamente en otras series [9, 52, 68, 192]. El síntoma más frecuente al inicio de la ES en ambos grupos fue el FR, y en el caso de considerar únicamente otros síntomas diferentes al FR, la artritis y los dedos en salchicha fueron los síntomas más prevalentes en el grupo con anti-PM/Scl frente al endurecimiento cutáneo en el grupo de anti-Scl-70. Dichos resultados contrastan con los descritos previamente, donde se encontraba una menor frecuencia de FR como primer síntoma de la enfermedad en los pacientes con anti-PM/Scl [193]. La prevalencia del subtipo cutáneo ES difusa en los pacientes con anti-Scl-70 fue similar al 60-71% descrito por cohortes previas [9, 52, 68]. El 92.9% de los pacientes del grupo con el anticuerpo anti-PM/Scl presentaron un subtipo ES limitada, lo que contrasta con una prevalencia de ES difusa del 22 – 43.7% según estudios anteriores [68, 172, 177], que pudiera justificarse por el bajo porcentaje de ES difusa en Europa y en la población caucásica [194].

En el grupo anti-PM/Scl la vasculopatía periférica y las UDs fueron menos frecuentes, incluso menos prevalentes que en cohortes previas de este anticuerpo, probablemente porque en este estudio no se consideró como vasculopatía periférica la presencia de capilares alterados en la capilaroscopia [177]. Se encontró una mayor prevalencia de afección gastrointestinal en los pacientes con anti-Scl-70, y por el contrario, la miopatía inflamatoria fue más frecuente entre los pacientes con anti-PM/Scl (en el 71.4% de ellos), similar a trabajos anteriores [170, 172, 177]. En este estudio no hubo

diferencias entre la prevalencia en ambos grupos en relación a la presencia de la HP, pero sí que fue superior a la observada en otras series. La mayor prevalencia observada puede justificarse porque la HP se definió por métodos ecocardiográficos con una PAPs > 40 mmHg y por lo tanto los pacientes pudieron presentar más frecuentemente HP secundaria a patología restrictiva por EPI avanzada [9, 68, 177, 195].

Respecto a la evolución pulmonar, en el presente trabajo se observó una estabilización de los parámetros pulmonares en pacientes con EPI y con el anticuerpo anti-PM/Scl, tal y como ya se había observado en estudios previos [176]. La enfermedad extensa según el TACAR se encontró en más de la mitad de los pacientes de ambos grupos. La edad al diagnóstico de EPI y el tiempo de seguimiento tras el diagnóstico de la misma fue similar entre ambos grupos y también similar a la descrita por estudios previos [196]. Los pacientes que presentaban positividad para el anticuerpo anti-PM/Scl tuvieron menos disnea. De acuerdo con las guías de la ATS/ERS sólo el 15.4% de ellos presentaron un empeoramiento significativo de la FVC (>10%) durante el seguimiento, un 30.8% tuvieron una mejoría significativa de la FVC y el 53.8% restantes se mantuvieron estables. Sin embargo, en el grupo de anti-Scl-70, un 51.4% de pacientes presentaron un descenso de la FVC significativa. Además, en los pacientes con anti-PM/Scl hubo un aumento absoluto del 0.1%/año en la mediana de variación de la FVC ajustada por año de seguimiento, siendo significativamente mejor al descenso absoluto del 1.8%/año objetivado en el grupo con anti-Scl-70. Este deterioro de la función pulmonar fue ligeramente mejor al 3%/año descrito por Steen en la fase tardía de la enfermedad, este hallazgo se podría justificar por el largo tiempo de seguimiento y porque en el estudio actual hemos utilizado el descenso absoluto de la FVC y no el relativo como se utiliza en el estudio de Steen [99]. No se objetivaron diferencias en la variación de la KCO pero hay que tener en cuenta que un número no menospreciable de enfermos no se les pudo realizar

la determinación. Así, 11 pacientes del grupo de anti-Scl-70 tenían un volumen espiratorio forzado en el primer segundo inferior a 1 litro, necesario para realizar de forma apropiada el test de difusión de CO, y otros pacientes tuvieron valores perdidos en la determinación de la KCO. Esta falta de datos supone un sesgo para la valoración de la KCO, dado que los pacientes más graves son excluidos debido a las dificultades metodológicas que hacen la técnica no válida para evaluar la afección pulmonar grave. Al final del seguimiento, el 7.7% de los pacientes con anticuerpos anti-PM/Scl desarrolló un patrón restrictivo grave o avanzado con una FVC < 50%, que contrasta con el 27% de la serie de Pittsburgh [68].

La buena evolución en los pacientes con anti-PM/Scl fue comparable a la previamente publicada en una cohorte de pacientes con conectivopatías asociadas a EPI con anticuerpos anti-sintetasas de RNA transferente, con una óptima respuesta al tratamiento inmunosupresor y un buen pronóstico [176]. En nuestro grupo, la miopatía inflamatoria pudo haber afectado tanto los valores de la FVC iniciales, como la evolución de la FVC en el seguimiento, ya que su incremento pudo ser secundario a la mejoría de la afección de la musculatura respiratoria tras recibir tratamiento por la miopatía. Pero hay que tener en cuenta que ninguno de los pacientes con miositis ($n = 13$) presentó una insuficiencia respiratoria ventilatoria ni requirieron soporte ventilatorio no invasivo o invasivo, ni se visualizó elevación de los diafragmas en las pruebas de radiología, lo cual sugiere que la afección musculoesquelética no jugó un papel importante en la valoración inicial de los parámetros pulmonares. En la misma línea, la miositis fue bien controlada con el tratamiento inmunosupresor y por lo tanto, al final de seguimiento la frecuencia de patrón restrictivo grave no se puede justificar por insuficiencia ventilatoria sino únicamente por afección pulmonar intersticial.

Respecto a las pautas de tratamiento administradas a lo largo de cualquier momento del seguimiento, los pacientes con anti-Scl-70 fueron más frecuentemente tratados con ciclofosfamida y micofenolato, debido a un abordaje terapéutico más agresivo del deterioro funcional respiratorio. Sin embargo, los inhibidores de la calcineurina fueron más frecuentemente utilizados en el grupo de anti-PM/Scl debido a la miopatía.

Koschik *et al.* publicaron recientemente un estudio de 76 pacientes con ES y anticuerpos anti-PM/Scl, comparándolos con pacientes con ES sin este anticuerpo, y demostró que su positividad tenía efectos protectores con una supervivencia acumulada del 91% a 10 años de seguimiento, midiendo ésta desde la fecha del primer diagnóstico médico de la ES [177]. En nuestra cohorte no se encontraron diferencias en las curvas de supervivencia global, probablemente porque ésta se estimó desde la fecha de diagnóstico de la EPI, lo cual resulta más preciso para detectar diferencias secundarias a la afectación pulmonar. Como un marcador subrogado de la supervivencia global y de la calidad de vida, analizamos la SLP y la supervivencia libre de enfermedad restrictiva grave, las cuales mostraron un mejor pronóstico de la EPI en los pacientes con el anticuerpo anti-PM/Scl.

Este buen curso clínico de los pacientes con anti-PM/Scl puede estar directamente relacionado con la positividad a dicho anticuerpo, pero no podemos infravalorar la baja frecuencia del subtipo ES difusa en nuestra cohorte o incluso la baja frecuencia de hipomotilidad esofágica [197].

La principal limitación del estudio fue el pequeño tamaño muestral, aunque fue lo suficiente como para indicar la diferente evolución entre ambos grupos de auto-anticuerpos, no permitió realizar un análisis multivariante. La duración de la enfermedad y los valores censurados durante el período de seguimiento pudieran haber producido un

sesgo en la valoración de los objetivos analizados al tratarse de un estudio retrospectivo. La ausencia de los datos de CCD en todos los pacientes con HP pudiera haber afectado al falso incremento de la prevalencia de esta grave complicación observada en nuestra cohorte.

Utilidad pronóstica del condensado de aire exhalado y el aire exhalado en la EPI-ES

Artículo 2: Guillen-Del Castillo A, Sanchez-Vidauurre S, Simeon-Aznar CP, Cruz MJ, Fonollosa-Pla V, Muñoz X. Prognostic Role of Exhaled Breath Condensate pH and Fraction Exhaled Nitric Oxide in Systemic Sclerosis Related Interstitial Lung Disease. Arch Bronconeumol. 2017;53:120-7.

Estudios previos han demostrado que los valores de pH en el CAE pueden estar disminuidos en el asma no controlado, en infecciones respiratorias, en pacientes con bronquiectasias, en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o en la fibrosis quística [198]. Sin embargo, en el caso de enfermedades pulmonares intersticiales se han encontrado valores elevados en la fibrosis pulmonar [199], y se encuentra disminuido en la asbestosis [200]. Hasta la fecha no hay estudios en la ES como marcador de la enfermedad ni como pronóstico. En nuestro estudio se objetivaron valores bajos de pH en el CAE en pacientes con hallazgos de vidrio deslustrado en el TACAR, respaldando la hipótesis de que los marcadores en el CAE pueden estar influenciados por el tipo de inflamación presente a nivel pulmonar. El papel pronóstico del pH en el CAE se disipaba cuando sólo se estudiaba a los pacientes no inmunodeprimidos, lo cual pudiera explicarse por la exclusión de los pacientes con EPI más grave y el pequeño tamaño muestral analizado. Los procesos inflamatorios pueden desencadenar un amplio rango de mecanismos responsables de la acidificación de las vías aéreas proximales como posible mecanismo innato de

defensa [201]. Estos mecanismos son la producción y excreción de iones superóxido y protones por las células epiteliales respiratorias, la inhibición de la actividad glutaminasa en la células epiteliales y finalmente el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, cuya lisis incrementa la acidez del entorno [202]. Aunque la presencia de una inflamación linfocítica alveolar es la característica en la ES, se ha descrito una inflamación neutrofílica a nivel bronquial, la cual es más marcada en aquellos pacientes con EPI [118]. De hecho, la acidificación producida por el reclutamiento de neutrófilos podría explicar perfectamente este componente inflamatorio.

En cuanto al valor predictivo del pH, en nuestro estudio sólo uno de los pacientes del grupo control sin EPI a nivel basal desarrolló esta complicación a los 45 meses de seguimiento, dicho paciente mostraba niveles elevados de pH en el CAE y de FeNO. Este hecho parece indicar que no existe una predicción a largo plazo del desarrollo de la EPI por los valores basales en el CAE, sin embargo no existe datos a corto plazo para verificar dichos resultados.

Respecto a la IL-6, estudios trasversales previos han correlacionado negativamente esta citoquina en el CAE con la capacidad pulmonar total, DLCO y KCO al momento de la valoración basal [112]. Se han encontrado valores elevados de IL-6 en el lavado broncoalveolar de pacientes con EPI-ES [203]. Además, los niveles aumentados de IL-6 en suero se han relacionado con la caída espirométrica o fallecimiento dentro del primer año en los pacientes con una EPI leve [111]. En este sentido, nuestro trabajo describe una tendencia en la asociación de niveles elevados de IL-6 de forma basal con valores bajos de DLCO al final del período de seguimiento.

En este estudio, utilizando el FeNO a una velocidad de flujo de 50 ml/s, los niveles basales bajos de NO fueron correlacionados con la FVC basal y con el descenso tanto de la FVC como de la DLCO a 4 años de seguimiento. Es la primera vez que se demuestra el valor pronóstico del FeNO en la EPI-ES, donde valores inferiores a 10.75 ppb fueron relacionados con una peor SLP. La FeNO representa la cantidad de NO exhalado como mezcla de la concentración alveolar de NO exhalado o CaNO y la difusión de NO de la vía aérea o JawNO [204]. A una velocidad de flujo mayor a 50 ml/s predomina la CaNO, pero velocidades menores representan la difusión de la vía aérea [205]. Moodley *et al.* encontraron niveles superiores de NO en pacientes con ES sin EPI frente a pacientes con EPI-ES o controles sanos [114]. Malerba *et al.* también demostraron niveles de FeNO menores en pacientes con EPI-ES respecto a pacientes sin EPI [115]. Otros autores compararon las cifras de FeNO en pacientes con ES sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con o sin EPI, incluso respecto a controles sanos [206]. De hecho, aunque sin alcanzar la significación estadística, nuestro estudio y todos los estudios previos han descrito valores menores de FeNO en los pacientes con EPI respecto a los pacientes sin esta afección orgánica [206, 207].

Sin embargo, en investigaciones enfocadas a analizar la CaNO han observado que este parámetro está aumentado en los pacientes con ES comparado con controles sanos [208], y está particularmente elevado en los pacientes con EPI-ES [117, 207]. Los niveles elevados de CaNO han sido asociados a un deterioro en la función pulmonar o fallecimiento con una especificidad del 90% [117].

En nuestro estudio, la velocidad de flujo seleccionada pudo haber afectado fruto de la baja representación del espacio alveolar. La CaNO no fue medida en el actual estudio por lo que no podemos aportar resultados. Los niveles disminuidos de la FeNO pudieran ser

explicados por una restricción de la producción de NO por la sintasa de NO en las vías aéreas proximales, como consecuencia de la inhibición debido a los altos niveles de CaNO secundarios a la inflamación pulmonar con una alta generación alveolar por la NO sintasa inducible. No obstante, los datos presentes demuestran que los pacientes con ES con niveles bajos de FeNO presentaron una peor evolución clínica durante el seguimiento, lo cual podría indicar la presencia de una EPI grave. Como la FeNO y la CaNO representan componentes del aire exhalados diferentes, son necesarios estudios más amplios para dilucidar el papel fisiopatológico del NO en la EPI asociada a la ES.

Un resultado novedoso resultante de nuestro estudio es la correlación entre niveles elevados de CO en AE y valores bajos de FVC tanto basales como a los 4 años de seguimiento en los pacientes con EPI-ES, aunque este hallazgo no ha demostrado tener un carácter pronóstico. Es bien conocido que muchas enfermedades pulmonares inflamatorias cursan con cifras elevadas de CO en el AE [209]. Hasta la fecha no hay ningún estudio que lo valore en la ES, aunque algunos autores han propuesto que patologías con alteración de la microcirculación puedan aumentar los niveles endógenos de CO [118, 210]. El hecho de que sólo uno de los pacientes con EPI fuera fumador activo y que fue instruido en evitar el consumo previo a la realización de la prueba, permitió descartar que el tabaco fuera responsable de esta relación encontrada.

La principal limitación de este estudio fue el tamaño muestral, que no permitió la realización de un análisis multivariante. La duración de la afección pulmonar no fue homogénea, lo cual pudiera infraestimar algunos de los biomarcadores inflamatorios debido a la inclusión de pacientes en estadios avanzados con un menor grado de inflamación pulmonar. Siete pacientes estaban bajo tratamiento inmunosupresor, lo cual pudiera haber afectado a los niveles de biomarcadores basales. Sin embargo, en el

subestudio realizado excluyendo estos pacientes no se encontraron cambios sustanciales a excepción de que no se evidenciaba el valor pronóstico del pH en el CAE. La falta de estandarización de la medición de los biomarcadores pudiera ser una limitación, así como la falta de repetibilidad de los resultados en CAE en los diferentes estudios analizando los pacientes con EPI-ES. Finalmente, no se pudo analizar la correlación entre los niveles de FeNO y CaNO debido a la falta de datos de CaNO en dichos pacientes.

Utilidad del algoritmo DETECT en el diagnóstico precoz de la HAP-ES

Artículo 3: Guillen-Del Castillo A, Callejas-Moraga EL, García G, Rodríguez-Palomares JF, Román A, Berastegui C, López-Meseguer M, Domingo E, Fonollosa-Pla V, Simeón-Aznar CP. 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. Aceptado

La aplicabilidad del algoritmo DETECT se limita a la población que cumpla con los criterios de inclusión que se establecieron en el estudio: duración de la ES superior a los 3 años desde el primer síntoma diferente al FR y una DLCO inferior al 60% del valor teórico. Estos criterios fueron implementados para incrementar la especificidad del método de cribaje ya que en una cohorte de 243 pacientes con HP asociada a ES menos del 10% de los pacientes presentaban valores de DLCO superiores al 60% [211]. Por otra parte, los pacientes no podían presentar ningún criterio de exclusión, como el diagnóstico previo de HP mediante CCD, presentar una FVC inferior al 40% o una afección cardíaca izquierda [126]. Y por último, el algoritmo DETECT no establece la periodicidad de valoración por este método y no ha sido explorada la capacidad para predecir la presencia de una PAPm \geq 21 mmHg o cualquier tipo de HP. A pesar de las limitaciones de dicho estudio, los

resultados del DETECT los han tenido en cuenta los expertos que han elaborado las nuevas guías de la ESC/ERS publicadas en el año 2015, reforzando la recomendación de un cribaje anual de HP en los pacientes con ES, e introduciendo el algoritmo DETECT como un método válido para ser realizado en este grupo de pacientes basado en la evidencia demostrada [124].

Comparado con el artículo de Coghlan *et al.*, los pacientes de nuestra cohorte presentaron una mayor prevalencia de telangiectasias y ACA. Casi el 60% de los pacientes con HAP mostraban clases funcionales I o II de la OMS y una reducción leve del test de caminar 6 minutos, comparable con las cohortes de detección de estudios previos enfocados en el diagnóstico temprano de la HAP [126, 135]. Este hecho refleja que los pacientes de nuestra cohorte a los que se les realizaba anualmente PFR y ecocardiograma Doppler fueron referidos de forma precoz a la realización del CCD por sospecha activa y temprana de la HAP durante su seguimiento. En el presente trabajo, el algoritmo DETECT exhibe una sensibilidad, especificidad y un valor de VPN similares al trabajo original, aunque con una mayor tasa de remisión al CCD y mayor VPP. Sin embargo, respecto a la aplicación de las guías de la ESC/ERS del 2009 se describió una mayor sensibilidad, especificidad, VPP y mayor tasa de remisión al CCD respecto al trabajo de Coghlan *et al.* Esto pudiera ser explicado debido a que la principal indicación de la realización del CCD en nuestro estudio fue la presencia de alteraciones ecocardiográficas que sugiriesen la presencia de HAP. Igualmente, la elevada tasa de remisión al CCD pudiera estar justificada como consecuencia de que el estudio fue realizado en una población seleccionada de pacientes con alto riesgo de HAP basado en datos clínicos, de pruebas de función respiratoria y de parámetros ecocardiográficos.

La aplicación del algoritmo DETECT ha sido estudiada en escasos grupos, Hao *et al.* analizaron el protocolo previo en pacientes de la cohorte multicéntrica australiana denominada “Australian Scleroderma Cohort Study” así como el algoritmo ASIG y las guías de la ESC/ERS del 2009 [138, 212]. Dichos autores encontraron una mayor sensibilidad y VPN usando el algoritmo DETECT o el ASIG respecto a las guías ESC/ERS del 2009, tal y como nosotros confirmamos en nuestro estudio. En su cohorte con el protocolo ASIG consiguieron una especificidad del 54%, superior que con el algoritmo DETECT (35.3%) e incluso mayor especificidad que cuando utilizaban las guías ESC/ERS (32.3%). Estos resultados difieren de los que Coghlan detectó en la cohorte del estudio DETECT ya que la especificidad del algoritmo fue más baja que la que se evidenció con las guías ESC/ERS 2009 (48% y 69% respectivamente) [126]. Los autores describieron que 9 pacientes no cumplían con el criterio de duración de la enfermedad o con una DLCO < 60%, lo que puede justificar la baja especificidad encontrada en el algoritmo DETECT en su cohorte [212]. Así mismo, los métodos de cribaje DETECT y ASIG en la cohorte australiana presentaron los mayores valores de sensibilidad y especificidad para identificar tanto la HP precapilar (incluyendo los grupos 1 y 3 de la clasificación) como cualquier tipo de HP. En nuestro estudio también pudimos identificar los 3 grupos de HP más frecuentes en la ES: HP Grupo 1 o HAP, Grupo 2 o postcapilar y Grupo 3 o asociada a EPI. En el presente trabajo no aplicamos el ASIG porque al tratarse de una serie histórica no disponíamos del valor del NT-proBNP.

Recientemente, un grupo checo diseñó un algoritmo modificando el DETECT, mediante la utilización del diámetro telediastólico en el tracto de salida del ventrículo derecho en lugar del área de la aurícula derecha [213]. Con este algoritmo modificado los autores calcularon una tasa de remisión de los pacientes al CCD del 41.4% mientras ésta fue del 24.1% utilizando las guías ESC/ERS del 2009. Aunque el CCD estaba

recomendado por el algoritmo DETECT modificado en 24/58 (41.4%) pacientes, éste sólo se realizó en 11 (18.9%) casos. De estos CCD realizados la HAP fue diagnosticada en 7 pacientes, 2 pacientes presentaron HP asociada a cardiopatía izquierda y otros 2 pacientes HP asociada a EPI. Por tanto, los autores sugieren que el algoritmo DETECT modificado puede ser útil para recomendar la realización del CCD para el diagnóstico tanto de HAP como de HP del grupo 2 o 3 de la clasificación de la OMS.

Aunque existen discrepancias en el valor pronóstico de la HP limítrofe, recientemente se ha publicado un estudio en el que se evidencia un riesgo aumentado de mortalidad y hospitalización en la cohorte veteranos de EEUU con una HP limítrofe (definida con valores entre 19-24 mmHg) [214]. Por consiguiente, el estudio destacó la relevancia de diagnosticar la HP limítrofe en grupos seleccionados de pacientes como es el caso de la ES. En un análisis post-hoc del estudio DETECT, los autores observaron que los pacientes con HP limítrofe tenían un perfil asociado a riesgo de HAP ya que tuvieron un mayor cociente FVC/DLCO, una mayor VRT y valores de NT-proBNP superiores a los pacientes con una PAPm normal. En el subanálisis no se evaluó la aplicación del algoritmo DETECT en el grupo de enfermos con HP limítrofe [126]. Por ello no resulta sorprendente que en nuestro estudio los pacientes con HP limítrofe presentaban una mayor tasa de remisión al CCD, lo cual puede explicar el incremento de la especificidad objetivada del 64.3% para la detección de pacientes con una PAPm \geq 21 mmHg respecto a los que presentaban una PAPm $<$ 21 mmHg. En un artículo realizado por Valerio *et al.*, se evidenció que encontrar una HP limítrofe en el primer CCD era un factor de alto riesgo de desarrollar HP establecida comparado con los pacientes con una PAPm $<$ 21 mmHg con una HR de 3.7 durante el período de seguimiento [139]. En esta línea, el grupo PHAROS observó que el 55% de pacientes con HP limítrofe progresaba a HP, mientras que en el grupo de pacientes con PAPm $<$ 21 mmHg era del 32% tras una media de seguimiento de

25.7 meses [215]. Por lo tanto, los resultados de los trabajos comentados definen como factor de riesgo de HP la presencia de HP limítrofe y por lo tanto su identificación es de suma importancia porque los pacientes con ES con una HP limítrofe requieren una supervisión estrecha. El estudio actual es el primero en demostrar la idoneidad del algoritmo DETECT en la identificación de los pacientes con una PAPm ≥ 21 mmHg y no sólo en diagnosticar la HAP establecida.

La principal limitación de este estudio fue el diseño retrospectivo. El CCD no fue realizado en toda la cohorte de pacientes con ES, por tanto, algunas formas leves de HAP pudieran no haberse diagnosticado. En la misma línea, la periodicidad de los métodos de cribaje no está bien establecida y estos no fueron realizados en toda la cohorte, por lo que el porcentaje de pacientes remitidos al CCD pudiera no reflejar la tasa de remisión real de los pacientes a la realización del CCD.

10. CONCLUSIONES

Las siguientes conclusiones pueden ser extraídas de los trabajos publicados:

Artículo 1: Guillen-Del Castillo A, Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Alonso-Vila S, Reverte-Vinaixa MM, Muñoz X, Pallisa E, Selva-O'Callaghan A, Fernández-Codina A, Vilardell-Tarrés M. Good outcome of interstitial lung disease in patients with scleroderma associated to anti-PM/Scl antibody. *Semin Arthritis Rheum.* 2014;44:331-7.

1. Los pacientes con anticuerpo anti-PM/Scl presentan respecto al grupo de pacientes con anti-Scl-70 una mayor frecuencia de subtipo ES limitada y miopatía inflamatoria y menor prevalencia de enfermedad vasculopatía periférica y afección gastrointestinal.
2. La presencia de los anticuerpos anti-PM/Scl en los pacientes con EPI relacionada a la ES, está asociada a una estabilización de la FVC durante el seguimiento, una mayor SLP y una menor supervivencia libre de enfermedad respiratoria restrictiva grave.
3. El estudio del perfil de auto-anticuerpos presentes ante una misma afección orgánica como la EPI puede ser de gran importancia a la hora de establecer un pronóstico.

Artículo 2: Guillen-Del Castillo A, Sanchez-Vidaurre S, Simeon-Aznar CP, Cruz MJ, Fonollosa-Pla V, Muñoz X. Prognostic Role of Exhaled Breath Condensate pH and Fraction Exhaled Nitric Oxide in Systemic Sclerosis Related Interstitial Lung Disease. *Arch Bronconeumol.* 2017;53:120-7.

1. Los valores de FeNO en AE y de pH en CAE están implicados en la fisiopatología de la EPI-ES.
2. Valores bajos de pH en el CAE inferiores a 7.88 se relacionan con una menor supervivencia libre de progresión de la enfermedad.

3. Niveles de FeNO en el AE inferiores a 10.75 ppb se asocian a una peor supervivencia libre de progresión de la enfermedad.
4. En los pacientes con EPI-ES, existe una correlación inversa entre cifras elevadas de CO en AE tanto con niveles disminuidos de FVC de forma basal como al final del seguimiento.
5. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas para la asociación entre concentraciones aumentadas de IL-6 en CAE y los parámetros respiratorios durante el seguimiento.

Artículo 3: Guillen-Del Castillo A, Callejas-Moraga EL, García G, Rodríguez-Palomares JF, Román A, Berastegui C, López-Meseguer M, Domingo E, Fonollosa-Pla V, Simeón-Aznar CP. 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. Aceptado.

1. La validación del algoritmo DETECT en nuestra cohorte de enfermos presenta una alta sensibilidad y VPN, y disminuye el número de falsos negativos superando la capacidad diagnóstica de las recomendaciones previas.
2. La mayoría de enfermos diagnosticados de HAP siguiendo la práctica clínica habitual (PFR y ecocardiografía Doppler) presentan en el momento de su diagnóstico clases funcionales favorables (CF I-II) similares a las observadas en la cohorte DETECT.
3. Con el algoritmo DETECT también se identifican el grupo de enfermos con HP limítrofe y con HP del Grupo 2 y 3 de la clasificación de la OMS.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Curzio C. *Discussioni Anatomico-Pratiche di un raro e stravagante morbo cutaneo in una giovane Donna felicemente curato in questo grande Ospedale degl' Incurabili.* Napoli: Giovanni di Simone. Napoli: Giovanni di Simone. 1753.
2. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. *Scleroderma.* *N Engl J Med.* 2009;360:1989-2003.
3. Denton CP, Ong VH. *Targeted therapies for systemic sclerosis.* *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9:451-64.
4. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. *Systemic sclerosis.* *Nature Reviews Disease Primers.* 2015;1:15002.
5. Denton CP, Khanna D. *Systemic sclerosis.* *Lancet.* 2017, 10.1016/S0140-6736(17)30933-9.
6. Barnes J, Mayes MD. *Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers.* *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24:165-70.
7. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. *2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative.* *Ann Rheum Dis.* 2013;72:1747-55.
8. Andreasson K, Saxne T, Bergknut C, Hesselstrand R, Englund M. *Prevalence and incidence of systemic sclerosis in southern Sweden: population-based data with case ascertainment using the 1980 ARA criteria and the proposed ACR-EULAR classification criteria.* *Ann Rheum Dis.* 2014;73:1788-92.
9. Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Ramos-Casals M, Campillo-Grau M, et al. *Registry of the Spanish network for systemic sclerosis: clinical pattern according to cutaneous subsets and immunological status.* *Semin Arthritis Rheum.* 2012;41:789-800.

10. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore)*. 2002;81:139-53.
11. Sunderkotter C, Herrgott I, Bruckner C, Moinzadeh P, Pfeiffer C, Gerss J, et al. Comparison of patients with and without digital ulcers in systemic sclerosis: detection of possible risk factors. *Br J Dermatol*. 2009;160:835-43.
12. Nguyen C, Berezne A, Baubet T, Mestre-Stanislas C, Rannou F, Papelard A, et al. Association of gender with clinical expression, quality of life, disability, and depression and anxiety in patients with systemic sclerosis. *PLoS One*. 2011;6:e17551.
13. Elhai M, Avouac J, Walker UA, Matucci-Cerinic M, Riemekasten G, Airo P, et al. A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. *Ann Rheum Dis*. 2016;75:163-9.
14. Gelber AC, Manno RL, Shah AA, Woods A, Le EN, Boin F, et al. Race and association with disease manifestations and mortality in scleroderma: a 20-year experience at the Johns Hopkins Scleroderma Center and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2013;92:191-205.
15. Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Jr., Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum*. 2003;48:1956-63.
16. Freire M, Alonso M, Rivera A, Sousa A, Soto A, Gomez-Sousa JM, et al. Clinical peculiarities of patients with scleroderma exposed to silica: A systematic review of the literature. *Semin Arthritis Rheum*. 2015;45:294-300.
17. De Martinis M, Ciccarelli F, Sirufo MM, Ginaldi L. An overview of environmental risk factors in systemic sclerosis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016;12:465-78.
18. Marie I, Gehanno JF. Environmental risk factors of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37:463-73.

19. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15002.
20. Trojanowska M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6:453-60.
21. Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, Gourh P, Agarwal SK, McNearney TA, et al. Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum.* 2010;62:589-98.
22. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum.* 2007;56:1010-20.
23. Christmann RB, Sampaio-Barros P, Stifano G, Borges CL, de Carvalho CR, Kairalla R, et al. Association of Interferon- and transforming growth factor beta-regulated genes and macrophage activation with systemic sclerosis-related progressive lung fibrosis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:714-25.
24. Distler JH, Feghali-Bostwick C, Soare A, Asano Y, Distler O, Abraham DJ. Review: Frontiers of Antifibrotic Therapy in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69:257-67.
25. Hu B, Phan SH. Myofibroblasts. *Curr Opin Rheumatol.* 2013;25:71-7.
26. Ho YY, Lagares D, Tager AM, Kapoor M. Fibrosis--a lethal component of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10:390-402.
27. Masi AT, Rodnan GP, Medsger TAJ, Altman RD, D'Angelo WA, Fries JF, et al. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1980;23:581-90.

28. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.* 1988;15:202-5.
29. Johnson SR, Feldman BM, Hawker GA. Classification criteria for systemic sclerosis subsets. *J Rheumatol.* 2007;34:1855-63.
30. Denton CP, Black CM. Systemic sclerosis: current pathogenetic concepts and future prospects for targeted therapy. *Lancet.* 1996;347:1453-8.
31. LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001;28:1573-6.
32. Avouac J, Fransen J, Walker UA, Riccieri V, Smith V, Muller C, et al. Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:476-81.
33. Valentini G, Cuomo G, Abignano G, Petrillo A, Vettori S, Capasso A, et al. Early systemic sclerosis: assessment of clinical and pre-clinical organ involvement in patients with different disease features. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50:317-23.
34. Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, Roussin A, Abrahamowicz M, Boire G, 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;58:3902-12.
35. Czirjak L, Matucci-Cerinic M. Beyond Raynaud's phenomenon hides very early systemic sclerosis: the assessment of organ involvement is always mandatory. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50:250-1.

36. Matucci-Cerinic M, Bellando-Randone S, Lepri G, Bruni C, Guiducci S. Very early versus early disease: the evolving definition of the 'many faces' of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:319-21.
37. Saez-Comet L, Simeon-Aznar CP, Perez-Conesa M, Vallejo-Rodriguez C, Tolosa-Vilella C, Iniesta-Arandia N, et al. Applying the ACR/EULAR Systemic Sclerosis Classification Criteria to the Spanish Scleroderma Registry Cohort. *J Rheumatol.* 2015;42:2327-31.
38. Maricq HR, Carpentier PH, Weinrich MC, Keil JE, Palesch Y, Biro C, et al. Geographic variation in the prevalence of Raynaud's phenomenon: a 5 region comparison. *J Rheumatol.* 1997;24:879-89.
39. Belongia EA, Hedberg CW, Gleich GJ, White KE, Mayeno AN, Loegering DA, et al. An investigation of the cause of the eosinophilia-myalgia syndrome associated with tryptophan use. *N Engl J Med.* 1990;323:357-65.
40. Lakhpal S, Ginsburg WW, Michet CJ, Doyle JA, Moore SB. Eosinophilic fasciitis: clinical spectrum and therapeutic response in 52 cases. *Semin Arthritis Rheum.* 1988;17:221-31.
41. Cowper SE, Robin HS, Steinberg SM, Su LD, Gupta S, LeBoit PE. Scleromyxoedema-like cutaneous diseases in renal-dialysis patients. *Lancet.* 2000;356:1000-1.
42. Maragh SH, Davis MD, Bruce AJ, Nelson AM. Disabling pansclerotic morphea: clinical presentation in two adults. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53:S115-9.
43. Cole GW, Headley J, Skowsky R. Scleredema diabetorum: a common and distinct cutaneous manifestation of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1983;6:189-92.
44. Dinneen AM, Dicken CH. Scleromyxedema. *J Am Acad Dermatol.* 1995;33:37-43.
45. Fonseca E, Contreras F. Cutaneous mucinosis in the toxic oil syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 1987;16:139-40.

46. Steen VD. The many faces of scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am.* 2008;34:1-15.
47. Bryan C, Howard Y, Brennan P, Black C, Silman A. Survival following the onset of scleroderma: results from a retrospective inception cohort study of the UK patient population. *Br J Rheumatol.* 1996;35:1122-6.
48. Simeon CP, Armadans L, Fonollosa V, Vilardell M, Candell J, Tolosa C, et al. Survival prognostic factors and markers of morbidity in Spanish patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1997;56:723-8.
49. Jacobsen S, Halberg P, Ullman S. Mortality and causes of death of 344 Danish patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Br J Rheumatol.* 1998;37:750-5.
50. Hesselstrand R, Scheja A, Akesson A. Mortality and causes of death in a Swedish series of systemic sclerosis patients. *Ann Rheum Dis.* 1998;57:682-6.
51. Simeon CP, Armadans L, Fonollosa V, Solans R, Selva A, Villar M, et al. Mortality and prognostic factors in Spanish patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42:71-5.
52. Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, 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;66:754-63.
53. Joven BE, Almodovar R, Carmona L, Carreira PE. Survival, causes of death, and risk factors associated with mortality in Spanish systemic sclerosis patients: results from a single university hospital. *Semin Arthritis Rheum.* 2010;39:285-93.
54. Maurice R: De L'asphyxie Locale et de la Gangréne Symétrique des Extrémités. París: Leclerc: Facultad de París; 1862.
55. Brown KM, Middaugh SJ, Haythornthwaite JA, Bielory L. The effects of stress, anxiety, and outdoor temperature on the frequency and severity of Raynaud's attacks: the Raynaud's Treatment Study. *J Behav Med.* 2001;24:137-53.

56. Amanzi L, Braschi F, Fiori G, Galluccio F, Miniati I, Guiducci S, et al. Digital ulcers in scleroderma: staging, characteristics and sub-setting through observation of 1614 digital lesions. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:1374-82.
57. Steen V, Denton CP, Pope JE, Matucci-Cerinic M. Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48 Suppl 3:iii19-24.
58. Tolosa-Vilella C, Morera-Morales ML, Simeon-Aznar CP, Mari-Alfonso B, Colunga-Arguelles D, Callejas Rubio JL, et al. Digital ulcers and cutaneous subsets of systemic sclerosis: Clinical, immunological, nailfold capillaroscopy, and survival differences in the Spanish RESCLE Registry. *Semin Arthritis Rheum*. 2016;46:200-8.
59. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S, Martin R, et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1995;22:1281-5.
60. Furst DE, Clements PJ, Steen VD, Medsger TA, Jr., Masi AT, D'Angelo WA, et al. The modified Rodnan skin score is an accurate reflection of skin biopsy thickness in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1998;25:84-8.
61. Baron M, Pope J, Robinson D, Jones N, Khalidi N, Docherty P, et al. Calcinosis is associated with digital ischaemia in systemic sclerosis-a longitudinal study. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55:2148-55.
62. Avouac J, Guerini H, Wipff J, Assous N, Chevrot A, Kahan A, et al. Radiological hand involvement in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1088-92.
63. Rodnan GP, Medsger TA. The rheumatic manifestations of progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Clin Orthop Relat Res*. 1968;57:81-93.
64. Steen VD, Medsger TA, Jr. The palpable tendon friction rub: an important physical examination finding in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1997;40:1146-51.

65. Avouac J, Walker U, Tyndall A, Kahan A, Matucci-Cerinic M, Allanore Y, et al. Characteristics of joint involvement and relationships with systemic inflammation in systemic sclerosis: results from the EULAR Scleroderma Trial and Research Group (EUSTAR) database. *J Rheumatol.* 2010;37:1488-501.
66. Follansbee WP, Zerbe TR, Medsger TA, Jr. Cardiac and skeletal muscle disease in systemic sclerosis (scleroderma): a high risk association. *Am Heart J.* 1993;125:194-203.
67. Paik JJ, Wigley FM, Lloyd TE, Corse AM, Casciola-Rosen L, Shah AA, et al. Spectrum of Muscle Histopathologic Findings in Forty-Two Scleroderma Patients With Weakness. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2015;67:1416-25.
68. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2005;35:35-42.
69. Rozman B, Cucnik S, Sodin-Semrl S, Czirjak L, Varju C, Distler O, 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;67:1282-6.
70. Shreiner AB, Murray C, Denton C, Khanna D. Gastrointestinal Manifestations of Systemic Sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord.* 2016;1:247-56.
71. Gyger G, Baron M. Systemic Sclerosis: Gastrointestinal Disease and Its Management. *Rheum Dis Clin North Am.* 2015;41:459-73.
72. Wipff J, Allanore Y, Soussi F, Terris B, Abitbol V, Raymond J, et al. Prevalence of Barrett's esophagus in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2882-8.
73. Kirby DF, Chatterjee S. Evaluation and management of gastrointestinal manifestations in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 2014;26:621-9.

74. Ingraham KM, O'Brien MS, Shenin M, Derk CT, Steen VD. Gastric antral vascular ectasia in systemic sclerosis: demographics and disease predictors. *J Rheumatol.* 2010;37:603-7.
75. Bures J, Cyrany J, Kohoutova D, Forstl M, Rejchrt S, Kvetina J, et al. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. *World J Gastroenterol.* 2010;16:2978-90.
76. Di Ciaula A, Covelli M, Berardino M, Wang DQ, Lapadula G, Palasciano G, et al. Gastrointestinal symptoms and motility disorders in patients with systemic scleroderma. *BMC Gastroenterol.* 2008;8:7.
77. Wang SJ, Lan JL, Chen DY, Chen YH, Hsieh TY, Lin WY. Colonic transit disorders in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2001;20:251-4.
78. Assassi S, Fritzler MJ, Arnett FC, Norman GL, Shah KR, Gourh P, et al. Primary biliary cirrhosis (PBC), PBC autoantibodies, and hepatic parameter abnormalities in a large population of systemic sclerosis patients. *J Rheumatol.* 2009;36:2250-6.
79. Fernandez-Codina A, Simeon-Aznar CP, Pinal-Fernandez I, Rodriguez-Palomares J, Pizzi MN, Hidalgo CE, et al. Cardiac involvement in systemic sclerosis: differences between clinical subsets and influence on survival. *Rheumatol Int.* 2017;37:75-84.
80. Avouac J, Meune C, Chenevier-Gobeaux C, Borderie D, Lefevre G, Kahan A, 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;67:1022-30.
81. Desai CS, Lee DC, Shah SJ. Systemic sclerosis and the heart: current diagnosis and management. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23:545-54.
82. Byers RJ, Marshall DA, Freemont AJ. Pericardial involvement in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1997;56:393-4.
83. Kobayashi H, Yokoe I, Hirano M, Nakamura T, Nakajima Y, Fontaine KR, et al. Cardiac magnetic resonance imaging with pharmacological stress perfusion and

- delayed enhancement in asymptomatic patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2009;36:106-12.
84. Assassi S, Del Junco D, Sutter K, McNearney TA, Reveille JD, Karnavas A, et al. Clinical and genetic factors predictive of mortality in early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2009;61:1403-11.
85. Traub YM, Shapiro AP, Rodnan GP, Medsger TA, McDonald RH, Jr., Steen VD, et al. Hypertension and renal failure (scleroderma renal crisis) in progressive systemic sclerosis. Review of a 25-year experience with 68 cases. *Medicine (Baltimore).* 1983;62:335-52.
86. Lynch BM, Stern EP, Ong V, Harber M, Burns A, Denton CP. UK Scleroderma Study Group (UKSSG) guidelines on the diagnosis and management of scleroderma renal crisis. *Clin Exp Rheumatol.* 2016;34 Suppl 100:106-9.
87. Teixeira L, Mounthon L, Mahr A, Berezne A, Agard C, Mehrenberger M, et al. Mortality and risk factors of scleroderma renal crisis: a French retrospective study of 50 patients. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:110-6.
88. Denton CP, Lapadula G, Mounthon L, Muller-Ladner U. Renal complications and scleroderma renal crisis. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48 Suppl 3:iii32-5.
89. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:940-4.
90. Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Campillo-Grau M, Ramos-Casals M, et al. Registry of the Spanish Network for Systemic Sclerosis: Survival, Prognostic Factors, and Causes of Death. *Medicine (Baltimore).* 2015;94:e1728.
91. Rubio-Rivas M, Simeon-Aznar CP, Velasco C, Mari-Alfonso B, Espinosa G, Corbella X, et al. Changes in the pattern of death of 987 patients with systemic sclerosis from

- 1990 to 2009 from the nationwide Spanish Scleroderma Registry (RESCLE). *Clin Exp Rheumatol*. 2017.
92. D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med*. 1969;46:428-40.
93. Launay D, Remy-Jardin M, Michon-Pasturel U, Mastora I, Hachulla E, Lambert M, et al. High resolution computed tomography in fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2006;33:1789-801.
94. Greidinger EL, Flaherty KT, White B, Rosen A, Wigley FM, Wise RA. African-American race and antibodies to topoisomerase I are associated with increased severity of scleroderma lung disease. *Chest*. 1998;114:801-7.
95. De Santis M, Bosello SL, Peluso G, Pinnelli M, Alivernini S, Zizzo G, et al. Bronchoalveolar lavage fluid and progression of scleroderma interstitial lung disease. *Clin Respir J*. 2012;6:9-17.
96. Goh NS, Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM, Copley SJ, Maher TM, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:1248-54.
97. Wells AU. High-resolution computed tomography and scleroderma lung disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47 Suppl 5:v59-61.
98. Peters-Golden M, Wise RA, Hochberg MC, Stevens MB, Wigley FM. Carbon monoxide diffusing capacity as predictor of outcome in systemic sclerosis. *Am J Med*. 1984;77:1027-34.
99. Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA, Jr. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1994;37:1283-9.
100. Wanger J, Clausen JL, Coates A, Pedersen OF, Brusasco V, Burgos F, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J*. 2005;26:511-22.

101. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J.* 2005;26:319-38.
102. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:646-64.
103. Raghu G, Brown KK, Bradford WZ, Starko K, Noble PW, Schwartz DA, et al. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2004;350:125-33.
104. Goh NS, Veeraraghavan S, Desai SR, Cramer D, Hansell DM, Denton CP, et al. Bronchoalveolar lavage cellular profiles in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease are not predictive of disease progression. *Arthritis Rheum.* 2007;56:2005-12.
105. Goh NS, Hoyles RK, Denton CP, Hansell DM, Renzoni EA, Maher TM, et al. Short term pulmonary function trends are predictive of mortality in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2017, 10.1002/art.40130.
106. Raghu G, Behr J, Brown KK, Egan JJ, Kawut SM, Flaherty KR, et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with ambrisentan: a parallel, randomized trial. *Ann Intern Med.* 2013;158:641-9.
107. Antoniou KM, Wells AU. Scleroderma lung disease: evolving understanding in light of newer studies. *Curr Opin Rheumatol.* 2008;20:686-91.
108. Silver RM, Wells AU. Histopathology and bronchoalveolar lavage. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47 Suppl 5:v62-4.
109. ETS TJsotAa. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:646-64.

110. Solomon JJ, Olson AL, Fischer A, Bull T, Brown KK, Raghu G. Scleroderma lung disease. *Eur Respir Rev*. 2013;22:6-19.
111. De Lauretis A, Sestini P, Pantelidis P, Hoyles R, Hansell DM, Goh NS, et al. Serum interleukin 6 is predictive of early functional decline and mortality in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2013;40:435-46.
112. Edme JL, Tellart AS, Launay D, Neviere R, Grutzmacher C, Boulenguez C, et al. Cytokine concentrations in exhaled breath condensates in systemic sclerosis. *Inflamm Res*. 2008;57:151-6.
113. Tufvesson E, Bozovic G, Hesselstrand R, Bjermer L, Scheja A, Wuttge DM. Increased cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostanate in exhaled breath condensate from systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:2322-6.
114. Moodley YP, Laloo UG. Exhaled nitric oxide is elevated in patients with progressive systemic sclerosis without interstitial lung disease. *Chest*. 2001;119:1449-54.
115. Malerba M, Radaeli A, Ragnoli B, Airo P, Corradi M, Ponticiello A, et al. Exhaled nitric oxide levels in systemic sclerosis with and without pulmonary involvement. *Chest*. 2007;132:575-80.
116. Wuttge DM, Bozovic G, Hesselstrand R, Aronsson D, Bjermer L, Scheja A, et al. Increased alveolar nitric oxide in early systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28:S5-9.
117. Tieb KP, Hua-Huy T, Kettaneh A, Allanore Y, Le-Dong NN, Duong-Quy S, et al. Alveolar concentration of nitric oxide predicts pulmonary function deterioration in scleroderma. *Thorax*. 2012;67:157-63.
118. Sanchez-Vidaurre S, Simeon CP, Cruz MJ, Fonollosa V, Vilardell M, Morell F, et al. Latent pulmonary inflammation in patients with systemic sclerosis. *Arch Bronconeumol*. 2012;48:8-13.

119. Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, Davar J, et al. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:1088-93.
120. Avouac J, Airo P, Meune C, Beretta L, Dieude P, Caramaschi P, et al. Prevalence of pulmonary hypertension in systemic sclerosis in European Caucasians and metaanalysis of 5 studies. *J Rheumatol.* 2010;37:2290-8.
121. Nihtyanova SI, Schreiber BE, Ong VH, Rosenberg D, Moinzadeh P, Coghlan JG, et al. Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:1625-35.
122. Rubenfire M, Huffman MD, Krishnan S, Seibold JR, Schiopu E, McLaughlin VV. Survival in systemic sclerosis with pulmonary arterial hypertension has not improved in the modern era. *Chest.* 2013;144:1282-90.
123. Simeon-Aznar CP, Tolosa-Vilella C, Gabarro-Julia L, Campillo-Grau M, Guillen Del Castillo A, Fonollosa-Pla V, et al. Systemic sclerosis sine scleroderma and limited cutaneous systemic sclerosis: similarities and differences. *Clin Exp Rheumatol.* 2014;32:S-33-40.
124. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, 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.
125. Coghlan JG, Denton CP, Grunig E, Bonderman D, Distler O, Khanna D, et al. Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:1340-9.

126. Visovatti SH, Distler O, Coghlun JG, Denton CP, Grunig E, Bonderman D, et al. Borderline pulmonary arterial pressure in systemic sclerosis patients: a post-hoc analysis of the DETECT study. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:493.
127. Williams MH, Handler CE, Akram R, Smith CJ, Das C, Smee J, et al. Role of N-terminal brain natriuretic peptide (N-TproBNP) in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2006;27:1485-94.
128. Steen V, Medsger TA, Jr. Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum.* 2003;48:516-22.
129. Schreiber BE, Valerio CJ, Keir GJ, Handler C, Wells AU, Denton CP, et al. Improving the detection of pulmonary hypertension in systemic sclerosis using pulmonary function tests. *Arthritis Rheum.* 2011;63:3531-9.
130. Allanore Y, Borderie D, Avouac J, Zerkak D, Meune C, Hachulla E, et al. High N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels and low diffusing capacity for carbon monoxide as independent predictors of the occurrence of precapillary pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:284-91.
131. Condliffe R, Kiely DG, Peacock AJ, Corris PA, Gibbs JS, Vrapi F, et al. Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension in the modern treatment era. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:151-7.
132. Launay D, Sitbon O, Le Pavec J, Savale L, Tcherakian C, Yaici A, et al. Long-term outcome of systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension treated with bosentan as first-line monotherapy followed or not by the addition of prostanoids or sildenafil. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49:490-500.
133. York M, Farber HW. Pulmonary hypertension: screening and evaluation in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23:536-44.

134. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, et al. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3792-800.
135. Humbert M, Yaici A, de Groote P, Montani D, Sitbon O, Launay D, et al. Screening for pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis: clinical characteristics at diagnosis and long-term survival. *Arthritis Rheum.* 2011;63:3522-30.
136. Chung L, Domsic RT, Lingala B, Alkassab F, Bolster M, Csuka ME, et al. Survival and predictors of mortality in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension: outcomes from the pulmonary hypertension assessment and recognition of outcomes in scleroderma registry. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2014;66:489-95.
137. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the 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 the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.* 2009;30:2493-537.
138. Thakkar V, Stevens W, Prior D, Youssef P, Liew D, Gabbay E, et al. The inclusion of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in a sensitive screening strategy for systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension: a cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2013;15:R193.
139. Valerio CJ, Schreiber BE, Handler CE, Denton CP, Coghlan JG. Borderline mean pulmonary artery pressure in patients with systemic sclerosis: transpulmonary gradient predicts risk of developing pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum.* 2013;65:1074-84.

140. Khanna D, Gladue H, Channick R, Chung L, Distler O, Furst DE, et al. Recommendations for screening and detection of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum.* 2013;65:3194-201.
141. Nihtyanova SI, Denton CP. Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6:112-6.
142. Reveille JD, Solomon DH, American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing G. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003;49:399-412.
143. Fertig N, Domsic RT, Rodriguez-Reyna T, Kuwana M, Lucas M, Medsger TA, Jr., et al. Anti-U11/U12 RNP antibodies in systemic sclerosis: a new serologic marker associated with pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2009;61:958-65.
144. Wiik AS, Hoier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun.* 2010;35:276-90.
145. Hachulla E, Carpentier P, Gressin V, Diot E, Allanore Y, Sibilia J, et al. Risk factors for death and the 3-year survival of patients with systemic sclerosis: the French ItinerAIR-Sclerodermie study. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48:304-8.
146. 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;42:534-40.
147. Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Komura K, Kaji K, et al. The clinical relevance of serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol.* 2008;158:487-95.
148. Penn H, Howie AJ, Kingdon EJ, Bunn CC, Stratton RJ, Black CM, et al. Scleroderma renal crisis: patient characteristics and long-term outcomes. *QJM.* 2007;100:485-94.

149. Rigamonti C, Shand LM, Feudjo M, Bunn CC, Black CM, Denton CP, et al. Clinical features and prognosis of primary biliary cirrhosis associated with systemic sclerosis. *Gut*. 2006;55:388-94.
150. Ioannidis JP, Vlachoyiannopoulos PG, Haidich AB, Medsger TA, Jr., Lucas M, Michet CJ, et al. Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data. *Am J Med*. 2005;118:2-10.
151. Sobanski V, Dauchet L, Lefevre G, Lambert M, Morell-Dubois S, Sy T, 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.
152. Ceribelli A, Cavazzana I, Airo 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;37:1544.
153. 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;62:2787-95.
154. Moinzadeh P, Fonseca C, Hellmich M, Shah AA, Chighizola C, Denton CP, et al. Association of anti-RNA polymerase III autoantibodies and cancer in scleroderma. *Arthritis Res Ther*. 2014;16:R53.
155. Joseph CG, Darrah E, Shah AA, Skora AD, Casciola-Rosen LA, Wigley FM, et al. Association of the autoimmune disease scleroderma with an immunologic response to cancer. *Science*. 2014;343:152-7.
156. Van Eenennaam H, Vogelzangs JH, Lugtenberg D, Van Den Hoogen FH, Van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Identity of the RNase MRP- and RNase P-associated Th/To autoantigen. *Arthritis Rheum*. 2002;46:3266-72.

157. Mitri GM, Lucas M, Fertig N, Steen VD, Medsger TA, Jr. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum.* 2003;48:203-9.
158. Fischer A, Pfalzgraf FJ, Feghali-Bostwick CA, Wright TM, Curran-Everett D, West SG, et al. Anti-th/to-positivity in a cohort of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Rheumatol.* 2006;33:1600-5.
159. Reimer G. Autoantibodies against nuclear, nucleolar, and mitochondrial antigens in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am.* 1990;16:169-83.
160. Tormey VJ, Bunn CC, Denton CP, Black CM. Anti-fibrillarin antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40:1157-62.
161. Aggarwal R, Lucas M, Fertig N, Oddis CV, Medsger TA, Jr. Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2009;60:1112-8.
162. Mehra S, Walker J, Patterson K, Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2013;12:340-54.
163. Ihn H, Yamane K, Yazawa N, Kubo M, Fujimoto M, Sato S, et al. Distribution and antigen specificity of anti-U1RNP antibodies in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1999;117:383-7.
164. Sobanski V, Giovannelli J, Lynch BM, Schreiber BE, Nihtyanova SI, Harvey J, et al. Characteristics and Survival of Anti-U1 RNP Antibody-Positive Patients With Connective Tissue Disease-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68:484-93.
165. Mahler M, Raijmakers R. Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmun Rev.* 2007;6:432-7.
166. Mahler M, Fritzler MJ. The changing landscape of the clinical value of the PM/Scl autoantibody system. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:106.

167. Wolfe JF, Adelstein E, Sharp GC. Antinuclear antibody with distinct specificity for polymyositis. *J Clin Invest.* 1977;59:176-8.
168. Reichlin M, Maddison PJ, Targoff I, Bunch T, Arnett F, Sharp G, et al. Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis overlap syndromes. *J Clin Immunol.* 1984;4:40-4.
169. Reimer G, Scheer U, Peters JM, Tan EM. Immunolocalization and partial characterization of a nucleolar autoantigen (PM-Scl) associated with polymyositis/scleroderma overlap syndromes. *J Immunol.* 1986;137:3802-8.
170. Genth E, Mierau R, Genetzky P, von Muhlen CA, Kaufmann S, von Wilmowsky H, et al. Immunogenetic associations of scleroderma-related antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 1990;33:657-65.
171. Oddis CV, Okano Y, Rudert WA, Trucco M, Duquesnoy RJ, Medsger TA, Jr. Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum.* 1992;35:1211-7.
172. Marguerie C, Bunn CC, Copier J, Bernstein RM, Gilroy JM, Black CM, et al. The clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to the nucleolar antigen PM-Scl. *Medicine (Baltimore).* 1992;71:327-36.
173. Hausmanowa-Petrusewicz I, Kowalska-Oledzka E, Miller FW, Jarzabek-Chorzelska M, Targoff IN, Blaszczyk-Kostanecka M, et al. Clinical, serologic, and immunogenetic features in Polish patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1257-66.
174. Vandergheynst F, Ocmant A, Sordet C, Humbel RL, Goetz J, Roufosse F, et al. Anti-pm/scl antibodies in connective tissue disease: Clinical and biological assessment of 14 patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24:129-33.
175. Selva-O'Callaghan A, Labrador-Horillo M, Solans-Laqué R, Simeon-Aznar CP, Martinez-Gómez X, Vilardell-Tarres M. Myositis-specific and myositis-associated

- antibodies in a series of eighty-eight Mediterranean patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum.* 2006;55:791-8.
176. Lega JC, Cottin V, Fabien N, Thivolet-Bejui F, Cordier JF. Interstitial lung disease associated with anti-PM/Scl or anti-aminoacyl-tRNA synthetase autoantibodies: a similar condition? *J Rheumatol.* 2010;37:1000-9.
177. Koschik RW, 2nd, Fertig N, Lucas MR, Domsic RT, Medsger TA, Jr. Anti-PM-Scl antibody in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30:S12-6.
178. Bernal-Bello D, de Tena JG, Guillen-Del Castillo A, Selva-O'Callaghan A, Callejas-Moraga EL, Marin-Sanchez AM, et al. Novel risk factors related to cancer in scleroderma. *Autoimmun Rev.* 2017;16:461-8.
179. Mimori T, Hardin JA, Steitz JA. Characterization of the DNA-binding protein antigen Ku recognized by autoantibodies from patients with rheumatic disorders. *J Biol Chem.* 1986;261:2274-8.
180. Belizna C, Henrion D, Beucher A, Lavigne C, Ghaali A, Levesque H. Anti-Ku antibodies: Clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmun Rev.* 2010;9:691-4.
181. Wassarman KM, Steitz JA. The low-abundance U11 and U12 small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) interact to form a two-snRNP complex. *Mol Cell Biol.* 1992;12:1276-85.
182. Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Campillo-Grau M, Ramos-Casals M, et al. Registry of the Spanish Network for Systemic Sclerosis: Survival, Prognostic Factors, and Causes of Death. *Medicine (Baltimore).* 2015;94:e1728.
183. 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;103:109-15.

184. Ferri C, Sebastiani M, Lo Monaco A, Iudici M, Giuggioli D, Furini F, et al. Systemic sclerosis evolution of disease pathomorphosis and survival. Our experience on Italian patients' population and review of the literature. *Autoimmun Rev.* 2014;13:1026-34.
185. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airo P, Cozzi F, Carreira PE, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1809-15.
186. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeon CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2014;44:208-19.
187. Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y, et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2016, 10.1136/annrheumdis-2016-209909.
188. Tashkin DP, Roth MD, Clements PJ, Furst DE, Khanna D, Kleerup EC, et al. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomised controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir Med.* 2016;4:708-19.
189. Sitbon O, Channick R, Chin KM, Frey A, Gaine S, Galie N, et al. Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med.* 2015;373:2522-33.
190. McLaughlin V, Channick RN, Ghofrani HA, Lemarie JC, Naeije R, Packer M, et al. Bosentan added to sildenafil therapy in patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2015;46:405-13.
191. Galie N, Barbera JA, Frost AE, Ghofrani HA, Hoeper MM, McLaughlin VV, et al. Initial Use of Ambrisentan plus Tadalafil in Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med.* 2015;373:834-44.
192. Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M, Reichenberger F, 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:R172.
193. Reimer G, Steen VD, Penning CA, Medsger TA, Jr., Tan EM. Correlates between autoantibodies to nucleolar antigens and clinical features in patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1988;31:525-32.
194. Steen V, Domsic RT, Lucas M, Fertig N, Medsger TA, Jr. A clinical and serologic comparison of African American and Caucasian patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2986-94.
195. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:S43-54.
196. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, Colby TV, Polychronopoulos V, Pantelidis P, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1581-6.
197. Zhang XJ, Bonner A, Hudson M, Baron M, Pope J. Association of gastroesophageal factors and worsening of forced vital capacity in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2013;40:850-8.
198. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1364-70.
199. Chow S, Thomas PS, Malouf M, Yates DH. Exhaled breath condensate (EBC) biomarkers in pulmonary fibrosis. *J Breath Res.* 2012;6:016004.
200. Chow S, Campbell C, Sandrini A, Thomas PS, Johnson AR, Yates DH. Exhaled breath condensate biomarkers in asbestos-related lung disorders. *Respir Med.* 2009;103:1091-7.

201. Gaston B, Hunt JF. Measurement of exhaled breath condensate pH: Implications for pathophysiology and monitoring of inflammatory airway diseases. In: Montuschi P, ed. *New perspectives in monitoring lung inflammation: Analysis of exhaled breath condensate*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2005:73–84.
202. Montuschi P. Analysis of exhaled breath condensate: methodological issues. In Montuschi P, ed. *New perspectives in monitoring lung inflammation: Analysis of exhaled breath condensate*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2005:11–30.
203. Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, Witt C, Meisel C, Hanitsch LG, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R111.
204. George SC, Hogman M, Permutt S, Silkoff PE. Modeling pulmonary nitric oxide exchange. *J Appl Physiol (1985)*. 2004;96:831-9.
205. Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol (1985)*. 1998;85:653-66.
206. Tieb KP, Cabane J, Aubourg F, Kettaneh A, Ziani M, Mounthon L, et al. Severity of scleroderma lung disease is related to alveolar concentration of nitric oxide. *Eur Respir J.* 2007;30:26-30.
207. Grgis RE, Gugnani MK, Abrams J, Mayes MD. Partitioning of alveolar and conducting airway nitric oxide in scleroderma lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1587-91.
208. Fajac I, Kahan A, Menkes CJ, Dessanges JF, Dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT. Increased nitric oxide in exhaled air in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 1998;16:547-52.
209. Ryter SW, Choi AM. Carbon monoxide in exhaled breath testing and therapeutics. *J Breath Res.* 2013;7:017111.

210. Hughes JM. The single breath transfer factor (Tl,co) and the transfer coefficient (Kco): a window onto the pulmonary microcirculation. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2003;23:63-71.
211. Schwaiger JP, Khanna D, Gerry Coghlan J. Screening patients with scleroderma for pulmonary arterial hypertension and implications for other at-risk populations. *Eur Respir Rev*. 2013;22:515-25.
212. Hao Y, Thakkar V, Stevens W, Morrisroe K, Prior D, Rabusa C, et al. A comparison of the predictive accuracy of three screening models for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:7.
213. Soukup T, Pudil R, Kubinova K, Hromadkova L, Dusek J, Tosovsky M, et al. Application of the DETECT algorithm for detection of risk of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: data from a Czech tertiary centre. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55:109-14.
214. Maron BA, Hess E, Maddox TM, Opotowsky AR, Tedford RJ, Lahm T, et al. Association of Borderline Pulmonary Hypertension With Mortality and Hospitalization in a Large Patient Cohort: Insights From the Veterans Affairs Clinical Assessment, Reporting, and Tracking Program. *Circulation*. 2016;133:1240-8.
215. Bae S, Saggar R, Bolster MB, Chung L, Csuka ME, Derk C, et al. Baseline characteristics and follow-up in patients with normal haemodynamics versus borderline mean pulmonary arterial pressure in systemic sclerosis: results from the PHAROS registry. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:1335-42.

