



Università degli Studi di Firenze

DOTTORATO DI RICERCA IN
"Medicina clinica e sperimentale"

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Giacomo Laffi

**Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis (Diagnosi molto precoce della Sclerosi Sistemica) VEDOSS, 2010-2015 (2020).
Validazione dei segni e sintomi in uno studio prospettico osservazionale di coorte**

Settore Scientifico Disciplinare MED/16

Dottorando

Dott. Silvia Bellando Randone

Tutore

Prof. Marco Matucci Cerinic

Coordinatore

Prof. Giacomo Laffi

Anni 2010/2012

INDICE

PARTE PRIMA

1. LA SCLEROSI SISTEMICA (SSc)	1
1.1 Definizione e classificazione	3
1.2 Epidemiologia	9
1.3 Eziopatogenesi	11
1.3.1 Il danno vascolare	16
1.3.2 Il danno fibrotico	19
1.3.3 L'attivazione del sistema immunitario	20
1.3.3.1 Immunità umorale	21
1.3.3.2 Immunità cellulare	24
1.4 Manifestazioni cliniche	34
1.4.1 Fenomeno di Raynaud	34
1.4.2 Manifestazioni cutanee	37
1.4.3 Alterazioni dell'apparato locomotore	39
1.4.4 Alterazioni dell'apparato gastroenterico	39
1.4.5 Alterazioni dell'apparato respiratorio	44
1.4.6 Alterazioni dell'apparato cardiovascolare	45
1.4.7 Alterazioni dell'apparato urinario	49
1.4.8 Alterazioni del sistema nervoso	50
1.4.9 Alterazioni di altri organi	50
2. DIAGNOSI PRECOCE DELLA SSc	51
2.1 Videocapillaroscopia	55
3. EUSTAR E PROGETTO VEDOSS	58

PARTE SECONDA

4. INTRODUZIONE ALLA RICERCA	61
5. SCOPO DEL LAVORO	64
5.1 Obiettivi primari	64
6. MATERIALI E METODI	65
6.1 Pazienti	65
6.2 Manometria esofagea ed anorettale	69
6.3 Risonanza magnetica cardiaca con mdc	75
6.4 Ecocardiografia	76
6.5 Analisi statistica	78
7. RISULTATI	78
7.1 Progetto VEDOSS	78
7.1.1 Pazienti	78
7.1.2 Pazienti ANA+ vs pazienti ANA-	81
7.1.3 Manifestazioni cliniche nei pazienti ANA-	82
7.1.4 Pazienti ANA, FR, edema digitale vs pazienti con FR/ANA+ senza edema digitale	83
7.1.5 Pazienti con SSc molto precoce	84
7.1.6 Coinvolgimento degli organi interni in pazienti con SSc molto precoce	85
7.1.7 Pazienti con FR/ANA+ con positività autoanticorpale (ACA o anti-SCI70)	86
7.2 Coinvolgimento esofageo-anorettale in pazienti VEDOSS	86
7.2.1 Pazienti	86
7.2.2 Esofago e manometria esofagea	87

7.2.3	Manometria esofagea e segni clinici	95
7.2.4	Anoretto e manometria anorettale	97
7.2.5	Manometria anorettale e segni clinici	101
7.3	Coinvolgimento cardiaco in pazienti VEDOSS	104
7.3.1	Pazienti	104
7.3.2	Ecocardiografia	112
7.3.3	Risonanza magnetica cardiaca con mdc	114
7.3.4	Correlazione risonanza magnetica cardiaca, dati clinici e strumentali	118
7.3.5	Correlazione risonanza magnetica cardiaca ed ecocardiogramma	123

PARTE TERZA

8. DISCUSSIONE	127
9.CONCLUSIONI	137
10. BIBLIOGRAFIA	141

PARTE PRIMA

1. LA SCLEROSI SISTEMICA

La **Sclerosi Sistemica (SSc)**, anche conosciuta come **Sclerodermia** è una malattia infiammatoria cronica, multisistemica, del tessuto connettivo. Si caratterizza per un'alterata risposta immunitaria, produzione di autoanticorpi, danno diffuso microvascolare e fibrosi. Il deposito di collagene interessa non solo la cute ma anche gli organi interni creando alterazioni anatomiche ed importanti deficit funzionali (LeRoy et al., 1988; Steen VD, 1998; Generini S, 1999). La prima descrizione di un caso di sclerodermia è stata fatta da Curzio a Napoli, nel XVIII secolo. Il termine di "Sclerodermia" cioè "pelle indurita" (dal greco *skleros*: duro, e *derma*: pelle) a causa di fibrosi della cute che caratterizza questa patologia, è stato introdotto molto tempo dopo e solo in quest'ultimo secolo si è compreso che la malattia colpisce oltre alla cute, anche altri organi. Per tale motivo oggi è correntemente meglio definita "Sclerosi Sistemica". Questa entità patologica è stata definita da Osler come "the most terrible of human disease": è infatti terribile, per il paziente, assistere all'avanzare della malattia, che altera i lineamenti del viso e le espressioni mimiche, diminuisce le capacità funzionale delle mani dove compaiono ulcere cutanee dolorose e necrotiche, limita l'autosufficienza del paziente e altera, inoltre, importanti funzioni d'organo.

Pertanto la SSc è una malattia che compromette la qualità della vita e l'autonomia del paziente, inoltre i cambiamenti nell'aspetto fisico, legati come detto alla sclerosi cutanea, all'atrofia muscolare ed alle contratture articolari, hanno un impatto negativo

sulla sfera emotiva e sul benessere psicologico del soggetto (Merkel PA et al, 2002; Valentini G et al., 2007).

La prognosi della sclerosi sistemica appare ancora oggi molto grave. E' da tempo noto un aumentato rischio di mortalità nei soggetti affetti da SSc, oscillante tra 1.5 e 7.2, rispetto alla popolazione di controllo, per lo più conseguente a complicanze cardiache e polmonari (cuore polmonare cronico, aritmie, infarto) o complicanze renali (crisi renale sclerodermica). Negli ultimi anni si è comunque assistito ad una chiara riduzione della mortalità, con una sopravvivenza a 10 anni dell'80%-90% nei pazienti con la forma limitata e del 62%-76% nella forma diffusa, soprattutto dopo l'introduzione della terapia con ACE-inibitori per il trattamento della crisi renale sclerodermica (Steen VD, Medsger TA.,2007).

Al di là della mortalità la SSc è gravata da alti costi, che, in un recente studio italiano, sono stati quantizzati in 11,073.99 Euro/anno/paziente (Belotti Masserini A et al, 2003). Nonostante negli ultimi anni si sia verificata una vera esplosione di interesse per questa malattia e per i suoi meccanismi da parte di diverse branche di ricerca e clinica medica, il meccanismo patogenetico della malattia rimane ancora sconosciuto e nessun importante progresso è stato compiuto dal punto di vista clinico e terapeutico. Oltre alla necessità di migliorare e sviluppare le tecniche di indagine per i vari interessamenti viscerali, rimane quindi viva la "sete" di nuove e meno frammentarie conoscenze eziopatogenetiche.

Appare chiaro come la precocità di diagnosi e la possibilità di prevedere l'andamento futuro della malattia siano fondamentali per l'impostazione di una terapia razionale e per il miglioramento della prognosi, ma ancora più determinante appare come sia necessario cercare di comprendere le cause che scatenano il processo patologico.

1.1.DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE

La Sclerosi Sistemica (SSc) è una malattia multisistemica del connettivo ad eziologia ignota, caratterizzata dalla presenza di alterazioni microvascolari e da interessamento, con tendenza all'evoluzione fibrotica, di cute e numerosi organi e apparati (Seibold, 1989). Clinicamente la SSc si esprime con progressivo ispessimento e fibrosi della cute e con dei precisi quadri di interessamento degli organi interni (in particolare cuore, polmoni, tratto gastrointestinale e reni). Tra i vari criteri classificativi proposti della SSc, e più in generale dei quadri simil sclerodermici, quello clinico-descrittivo si è dimostrato il più utile, poiché correla la distribuzione e la gravità dell'interessamento cutaneo a specifici parametri laboratoristici, strumentali e prognostici.

La SSc fa parte di un gruppo di entità morbose che include due forme principali:

- una forma localizzata (sclerodermia localizzata)
- una forma sistemica (sclerosi sistemica).

La forma sistemica, a sua volta, può essere suddivisa in forme ad interessamento cutaneo limitato (*lcSSc*), cutaneo diffuso (*dcSSc*), o forme senza interessamento cutaneo (*SSc sine scleroderma*).

Inoltre si riconosce una serie di disordini "simil-sclerodermici" più o meno correlati con la sclerodermia, come le malattie indifferenziate del tessuto connettivo, le fibrosi localizzate e le forme ambientali.

La forma localizzata può essere a sua volta distinta in due varianti: la *morfea* e la *sclerodermia lineare*.

La *morfea* si presenta sotto forma di placche singole o multiple di indurimento cutaneo e può essere limitata, guttata o generalizzata.

La *sclerodermia lineare* invece interessa le estremità o il volto, e può associarsi a emiatrofia omolaterale a carico del volto. Infine esiste la variante lineare denominata "en coup de sabre". Queste sindromi non sono quasi mai associate ad interessamento

sistemico anche se possono essere associate a quadri sierologici autoimmunitari o a reperti istologici cutanei di tipo infiammatorio (tabelle 1.1a e 1.1b) (Falanga V., 1989).

Tabella 1.1a – Classificazione della sclerodermia	
Forme di sclerodermia localizzata o morfea:	
A placche	
1. Generalizzata	
Bollosa	
Lineare	
2. Profonda	
Forme di sclerodermia sistemica:	
limitata (fibrosi cutanea confinata alle estremità distali, sotto il gomito e le ginocchia);	
diffusa (fibrosi cutanea che si estende in maniera prossimale oltre il gomito e le ginocchia).	
NOTA: il coinvolgimento della cute del volto può comparire in entrambe le forme di sclerodermia sistemica.	

Tabella 1.1b – Spettro della sclerodermia e delle sindromi simil-sclerodermiche.	
<u>Fenomeno di Raynaud</u>	Primario o idiopatico (<i>malattia di Raynaud</i>) Secondario (<i>sindrome di Raynaud</i>)
<u>Sclerodermia localizzata</u>	Morfea (a placche, guttata, generalizzata) Lineare <i>En coup de sabre</i>
<u>Sclerodermia sistemica</u>	Sclerosi sistemica cutanea limitata Sclerosi sistemica cutanea diffusa
<u>Chimicamente indotta</u>	Ambientale / occupazionale Farmacologica

Malattie simil-sclerodermiche	Metaboliche
	Immunologiche / infiammatorie
	Sclerosi sistemica localizzata e malattie
	Viscerali

Non esiste un test diagnostico singolo per la SSc ed ancora oggi gli elementi di riferimento per l'identificazione dei casi e la loro confrontabilità sono rappresentati dai criteri preliminari proposti e pubblicati dall'American College of Rheumatology nel 1980 (Tabella 1.2) (Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee, 1980).

Tabella 1.2 – ARA Scleroderma Criteria Cooperative Study (SCCS): criteri clinici preliminari per la sclerosi sistemica.

- **Criterio maggiore**

La sclerodermia in qualunque localizzazione prossimale alle articolazioni metacarpofalangee è l'unico criterio principale (sensibilità 91%, specificità > 90%)

- **Criteri minori** (contribuiscono alla diagnosi in assenza di sclerodermia prossimale)

Sclerodattilia

Cicatrici a stampo dei polpastrelli o perdita di sostanza distale delle dita

Fibrosi polmonare bibasilar

N.B.: il criterio maggiore o due o più criteri minori si ritrovano nel 97% dei pazienti con sclerosi sistemica definita, ma soltanto nel 2% dei pazienti di confronto affetti da lupus eritematoso, polimiosite/dermatomiosite o fenomeno di Raynaud.

Per quanto riguarda la classificazione della SSc questa quindi rimane ancora difficile. È per tale motivo che in letteratura si sono riscontrati negli anni diversi tentativi e proposte: Il metodo che viene tuttora utilizzato si basa sul grado e sull'estensione del coinvolgimento cutaneo e sulla sua localizzazione.

Tutti questi fattori possono essere combinati tra loro in un modello di SSc a due sottotipi ("subsets") (tabella 1.3) (LeRoy et al., 1988):

- la SSc cutanea limitata (lcSSc)
- la SSc cutanea diffusa (dcSSc)

Tabella 1.3 – Subsets della sclerosi sistemica.
<p><i>SSc cutanea diffusa</i></p> <ul style="list-style-type: none">> Esordio del fenomeno di Raynaud entro 1 anno dall'inizio delle alterazioni cutanee /edema o sclerosi cutanea).> Coinvolgimento cutaneo acrale e del tronco.> Presenza di sfregamenti tendinei da attrito (tendon friction rubs).> Precoce e significativa incidenza di malattia interstiziale polmonare, insufficienza renale, oliguria, malattia gastrointestinale diffusa, coinvolgimento miocardico.> Assenza degli anticorpi anticentromero (ACA).> Dilatazione e distruzione dei capillari del letto ungueale.> Anticorpi antitopoisomerasi (30% dei pazienti). <p><i>SSc cutanea limitata</i></p> <ul style="list-style-type: none">> Fenomeno di Raynaud per anni.> Coinvolgimento cutaneo limitato a mani, faccia, piedi ed avambracci (acrale) o assente.

- > Significativa e tardiva incidenza di ipertensione polmonare, con o senza malattia interstiziale polmonare, nevralgia del trigemino, calcificazioni cutanee, teleangectasie.
- > Alta incidenza di ACA (70 – 80%).
- > Anse capillari dilatate di solito senza scomparsa dei capillari.

Oltre il 60% dei pazienti con SSc rientra nel *subset cutaneo limitato*, dove il coinvolgimento viscerale è un evento tardivo e tende a verificarsi da 10 a 30 anni dopo l'esordio del fenomeno di Raynaud (FR). Il termine "cutanea limitata" è preferibile alla vecchia definizione CREST (calcinosi, FR, disfagia esofagea, sclerodattilia, teleangectasie) perché sclerodattilia è un termine troppo ristretto per le manifestazioni cutanee limitate e la calcinosi può essere riscontrabile solo tardivamente o radiologicamente.

La SSc *cutanea diffusa*, la forma più grave e potenzialmente fatale di malattia, ha un'insorgenza più rapida, con danni d'organo importanti spesso entro i primi 5 anni dai primi sintomi.

A fini pratici, Steen e Medsger (Steen V. et al, 1990) hanno diviso ognuna di queste varianti in *fasi precoci (fase edematosa) e tardive (fase atrofica)* (Tabelle 1.4a -1.4b e 1.4c).

Tabella 1.4a - Criteri classificativi per la SSc in fase edematosa

Cute edematosa e sintomi lievi

Massima durata di malattia:

2 anni per la SSc diffusa

5 anni per la SSc limitata

Tabella 1.4b – Criteri classificativi per la SSc in fase atrofica

Cute fibrotica

Coinvolgimento di organi interni con sintomi specifici

Tabella 1.4c - Reperti caratteristici nelle fasi precoci e tardive dei subsets di SSc

CUTANEA DIFFUSA	PRECOCE (<5 aa dall'esordio)	TARDIVA (>5 aa dall'esordio)
Sintomi generali	Affaticamento	Nessuno
Ispessimento cutaneo	Progressione rapida	Stabile o regressione
Coinvolgimento viscerale	Aumentato rischio di coinvolgimento vascolare, muscolare, renale, miocardico, polmonare (interstiziale), gastrointestinale, deformità articolari, ulcere digitali	Deformità muscolo-scheletriche, progressione del coinvolgimento viscerale preesistente ma ridotto rischio di coinvolgimento ad altro organo
CUTANEA LIMITATA	PRECOCE (<10 aa dall'esordio)	TARDIVA (> 10 aa dall'esordio)
Sintomi generali	Nessuno	Solo secondari alle complicazioni sottostanti
Ispessimento cutaneo	Nessuno o minima progressione	Nessuna progressione
Coinvolgimento viscerale	Fenomeno di Raynaud, ulcere dei polpastrelli, sintomi esofagei	Fenomeno di Raynaud, ulcere dei polpastrelli, calcinosi, restringimento

		esofageo, malassorbimento del piccolo intestino, ipertensione polmonare (interstiziale od arteriosa
--	--	---

A differenza delle altre connettiviti, caratterizzate da episodi di riacutizzazione e remissione, la SSc ha un andamento monofasico, spesso relativamente benigno nel tempo, come si osserva particolarmente nella forma limitata caratterizzata da una prognosi migliore, o rapidamente progressivo con elevato rischio di mortalità, tipico della forma diffusa.

Nel 1996, Fine et al proposero di definire pre-sclerodermia condizioni caratterizzate da fenomeno di Raynaud, alterazioni digitali ischemiche, reperti capillaroscopici tipici (megacapillari e/o aree avascolari), anticorpi antinucleari marcatori di malattia (anti-topo I, anti-centromero, anti-RNA polimerasi III) (Fine LG, et al., 1996).

1.2. EPIDEMIOLOGIA

La SSc è una malattia presente in tutto il mondo e colpisce, sia pure con diversa incidenza, tutte le razze (Steen V., 1990). In letteratura si ritrovano pochi studi riguardo la sua incidenza e prevalenza, proprio per la sua bassa frequenza e per la difficoltà di portare avanti indagini attendibili. Infatti sono molti i fattori che conducono a questa situazione: la grande variabilità delle manifestazioni cliniche e della loro gravità, la difficoltà di applicare i criteri classificativi, la variabilità dei metodi utilizzati per gli studi epidemiologici. Tuttavia una dettagliata conoscenza dell'epidemiologia della SSc potrebbe essere utile per definire dei possibili fattori causali, o di rischio. (Chiffolt et al., 2008).

L'incidenza di questa patologia è stimata tra i 4 e i 20 nuovi casi per 1.000.000 per anno, mentre la prevalenza si aggira tra i 30 e 450 casi per 1.000.000 (Chiffolt et al., 2008; Mayes MD, 2003). In Italia le persone colpite sono circa 25.000, con circa 1.000 casi nuovi/anno, soprattutto fra le donne (Bellotti Masserini A. et al., 2003).

La prevalenza della SSc, sicuramente sottostimata in quanto molte forme oligosintomatiche e scarsamente evolutive non vengono diagnosticate, sembra variare nelle diverse aree geografiche: negli USA, infatti, appare maggiore che in Australia (rispettivamente 276/1.000.000 e 233/1.000.000); inoltre, in Europa, mostra un caratteristico gradiente Nord-Sud (Francia: 158/milione nel 2000; Inghilterra: 88/milione nel 2000) (Chiffot H et al., 2008).

L'età, il sesso e l'appartenenza etnica sembrano avere un certo ruolo nella suscettibilità alla patologia, così come nella sua espressione.

Il sesso femminile, come in altre patologie del tessuto connettivo, risulta più colpito di quello maschile, con un rapporto che varia, nelle varie casistiche, da 3 a 5:1. La predominanza del sesso femminile, più eclatante nel range di età tra i 15 ed i 40 anni, scende dopo la menopausa. Questi dati potrebbero suggerire una possibile influenza degli ormoni sessuali, degli eventi correlati alla gravidanza e di fattori ambientali correlati al sesso nello sviluppo della SSc, tuttavia a tal proposito non è ancora stato trovato nessun risultato significativo. Può insorgere a qualsiasi età, ma nella maggioranza dei casi si manifesta fra i 30 e i 50 anni (Ansell et al., 1994). Sono stati descritti casi di SSc, o presenza di altre malattie del tessuto connettivo, in diversi membri di una stessa famiglia. Questo elemento depone a favore di una possibile predisposizione ereditaria; ma gli studi sul possibile rapporto fra malattia e particolari fenotipi HLA (Human Leucocyte Antigens) (A1, B8, DR3, DR5 e anche DR2, DR4) sono risultati discordanti. La patologia sembra avere un'evidente tendenza ad aumentare. L'incremento numerico sembra dovuto, più che ad un aumento reale, al miglioramento della qualità diagnostica in questo campo, che ha permesso di accertare la malattia in

fasi sempre più precoci. È tuttavia da prendere in considerazione anche la possibilità che particolari fattori ambientali, con significato causale, possano risultare aumentati e, di conseguenza, produrre un effettivo incremento di incidenza della malattia (Cagnoni M et al., 1994).

1.3. EZIOPATOGENESI

La patogenesi della SSc è in larga parte ancora sconosciuta. Negli ultimi decenni sono stati fatti notevoli progressi nella comprensione di alcuni aspetti fondamentali della malattia come l'identificazione dell'abnorme produzione di collagene da parte dei fibroblasti, che comporta una fibrosi intensa, esuberante, non regolata; l'estesa alterazione del microcircolo, il danno endoteliale (Campbell PM and Le Roy EC, 1975) e l'anomala attivazione del sistema immunitario (Smith E. et al, 1994; LeRoy EC, 1992). Vi sono numerosi dati che confermano le anomalie in ognuno di questi aspetti, tuttavia non sono state ancora chiarite né le sottostanti basi della malattia, né l'evento anomalo scatenante iniziale. E' probabile che anomalie dell'endotelio e del sistema immunitario precedano l'accumulo progressivo di matrice che è segno distintivo della malattia e che esse, con ogni probabilità, svolgano un ruolo di primo piano nello sviluppo della reazione fibrotica; non è invece noto se le anomalie del sistema immunitario precedano (come la maggior parte degli studiosi ritiene) o seguano alterazioni nel circolo periferico. Se il danno e le alterazioni endoteliali e l'infiltrazione di linfociti T sono alterazioni tipiche delle fasi iniziali di malattia, la lesione finale che provoca danni ad organi ed apparati è la fibrosi. L'interazione tra cellule immunitarie, cellule endoteliali e cellule mesenchimali indica come le fasi iniziali di malattia possano porre le basi per le sequele a lungo termine della SSc, per cui le terapie dirette contro processi immunomediati vanno somministrate in fase precoce per poter fornire un significativo beneficio clinico (Smith E. et al, 1994). Vi sono dati convincenti che le anomalie immunitarie osservate nei pazienti correlino con l'espressione di malattia. Gli

attuali presidi terapeutici diretti contro componenti del sistema immunitario ottengono tuttavia, solo risultati parziali nell'influenzare la progressione di malattia. Quindi, pur in presenza di dati convincenti che implicano un meccanismo immunopatologico alla base della SSc, l'approccio terapeutico diretto al controllo del sistema immunitario non ha permesso, a tutt'oggi, di modificare il decorso della malattia. Sebbene una possibile interpretazione di questa dicotomia sia quella di ritenere che tutte le anomalie immunitarie siano fenomeni secondari, un'alternativa più probabile è quella di considerare che le anomalie immunitarie associate alla SSc abbiano una maggior influenza nelle fasi precoci di malattia. Nuovi dati relativi all'immunoregolazione, agli autoantigeni ed alla persistenza di cellule fetali nella vita adulta hanno favorito l'elaborazione di nuove teorie circa la patogenesi della malattia. Negli anni si sono susseguite diverse ipotesi eziologiche, che hanno chiamato in causa agenti infettivi, chimici e fisici.

Si è ipotizzato un'origine infettiva della SSc, focalizzando l'attenzione sull'azione di agenti soprattutto virali, ed, in particolare, sul *Citomegalovirus* umano (hCMV). Infatti nel siero dei pazienti affetti da SSc sono stati riscontrati elevati livelli di IgM e IgG anti-CMV; inoltre, gli anticorpi antitopoisomerasi I riconoscono epitopi antigenici presenti sulla proteina UL94 derivata dal Citomegalovirus umano. Poiché gli anticorpi, diretti contro UL94, inducono l'apoptosi di cellule endoteliali e l'attivazione dei fibroblasti presenti nel derma, due degli elementi fisiopatologici caratteristici della SSc, il mimetismo molecolare potrebbe essere un possibile legame tra l'infezione da CMV e SSc. Tuttavia altri agenti infettivi sono stati chiamati in causa, infatti alcuni studi hanno dimostrato nei pazienti sclerodermici alti livelli di IgM anti antigene del capsido del virus di Epstein Barr (EBV), ipotizzando pertanto un certo coinvolgimento di quest'ultimo nella patogenesi della SSc. Inoltre si è posta l'attenzione anche sul possibile ruolo del virus dell'epatite B (HBV) e del *Toxoplasma gondii* (Arnsen Y, 2009)

Sono stati condotti anche alcuni studi sul possibile coinvolgimento del Parvovirus B19 (B19V) nella patogenesi della patologia, basati sulla più alta prevalenza di B19V DNA in pazienti SSc rispetto ai controlli (Zakrzewska K, 2009). Altri fattori eziologici sono stati chiamati in causa, come quelli ambientali, soprattutto dopo che si è notata una particolare distribuzione dei casi di SSc, quasi a mostrare una sorta di raggruppamento geografico, tanto da poter giustificare l'ipotesi dell'esposizione ambientale a determinati agenti. Tuttavia attente indagini non sono ancora riuscite a spiegare questi *clusters*. È stato ipotizzato il ruolo di alcuni agenti chimici, come il cloruro di vinile, benzene, toluene, tricloroetilene, esacloroetano, anilina, silicio, cocaina ed alcuni farmaci anoressizzanti. Per quanto riguarda altri agenti chimici, come i solventi, le resine, nessuno studio, fino ad ora, ha fornito informazioni sufficienti per affermare il loro coinvolgimento nella patogenesi delle SSc (Silman AJ, 1990; Valesini G, 1993; Aryal BK, 2001; Thompson AE, 2002; Englert H, 2005).

Si è anche pensato che alcuni agenti fisici, come gli stimoli meccanici quali le vibrazioni ripetute, potessero avere un significato causale nella SSc, ma tale ipotesi non ha mai trovato conferma.

L'ipotesi genetica è stata una delle più studiate anche perché molti studi hanno dimostrato una certa aggregazione familiare della malattia (Herrick AL, 2002; Johnson RW, 2002).

A partire dall'inizio degli anni novanta sono state proposte diverse teorie che riguardano il ruolo dei *radicali liberi*, il *processo di apoptosi cellulare*, della *mimicria molecolare* e del *microchimerismo*. Queste potrebbero spiegare almeno in parte, l'evoluzione patogenetica della SSc.

Nel 1993 Murrell presentò l'ipotesi che i radicali liberi avessero un ruolo prominente nella patogenesi della SSc (Murrell D.F., 1993). Da allora il contributo che i radicali liberi hanno nel processo di danno endoteliale e nell'anomala attivazione dei fibroblasti è stato sempre più delineato dalla letteratura. Tutto ciò avviene nel ciclico processo di

ischemia e riperfusione che a livello clinico si manifesta col FR che causa danni a livello endoteliale per azione dei radicali liberi dell'ossigeno e di prodotti reattivi dell'azoto, conducendo così all'inattivazione degli enzimi antiossidanti ed ad un vero e proprio stress ossidativo. Quest'ultimo appare essere importante nella patogenesi della SSc poiché conduce ad un danno endoteliale con ispessimento dell'intima, restringimento del lume vasale, quindi ischemia, e fibrosi. Si è anche ipotizzato che le cellule endoteliali possano essere incapaci di adattarsi alle modificazioni indotte dal processo di riperfusione, oppure che gli eventi ciclici di ischemia-riperfusione possano condurre ad un esaurimento delle capacità endoteliali nel neutralizzare la formazione di radicali liberi (Matucci-Cerinic et al, 1998).

È proprio con il progredire della malattia ed il susseguirsi degli episodi di vasospasmo che a livello microvascolare si hanno le alterazioni strutturali caratteristiche della SSc. Comunque la modificazione del microcircolo si raggiunge solo dopo un complesso processo che coinvolge più elementi cellulari. I neutrofili, dopo essere attivati, esprimono molte molecole di adesione e a loro volta liberano una notevole quantità di radicali liberi; i monociti invece, liberano l'anione superossido (O_2^-) (Sambo P et al, 1999). In maniera simile le cellule endoteliali aumentano l'espressione di molecole di adesione e questo facilita il passaggio ai tessuti delle cellule mononucleate.

Tuttavia i danni maggiori rimangono quelli provocati dai radicali liberi: a livello della membrana cellulare provocano idrolisi dei fosfolipidi, inoltre causano una degradazione proteica e una frammentazione del DNA. Così il risultato finale è la morte della cellula o per necrosi o per apoptosi. In questo processo sembra essere coinvolto soprattutto il monossido di azoto (NO), che, prodotto in eccesso dai mononucleati circolanti, si trova in circolo in quantità aumentata, mentre le cellule dell'endotelio esprimono in quantità elevata la sintetasi inducibile di NO (iNOs) (Yamamoto T. et al., 1998; Cavallo G. et al., 1999; Andersen G.N. et al., 2000). I radicali liberi sono responsabili anche di altre alterazioni come le rotture cromosomiche

(Housset E. et al., 1969; Cotton SA. et al., 1999) e la frammentazione di autoantigeni, che può avere come conseguenza l'esposizione di epitopi immunocriptici negli antigeni self con successiva induzione di una risposta immune e genesi di autoanticorpi specifici (Emerit I. et al., 1997; Casciola-Rosen L. et al., 1997). Proprio questo meccanismo potrebbe spiegare il legame che c'è tra radicali liberi, interessamento microvascolare e attivazione del sistema immune (Peng SI et al., 1997).

Una possibile associazione tra i ripetuti stress ed il danno vascolare periferico che possa essere correlata ad eventi immunospecifici nei pazienti con SSc, rappresenta la base di questa teoria. Si ipotizza che, in uno stato di ischemia, certe proteine associate ai tessuti vascolari possano essere danneggiate da prodotti reattivi dell'ossigeno: andrebbero quindi a rappresentare il legame tra la comparsa clinica del FR e l'attivazione immunitaria. A livello endoteliale si riscontrano alterazioni funzionali di permeabilità e antitrombogenicità (Le Roy E.C., 1996). Queste alterazioni si hanno nella prima fase della malattia, quella edematosa, pertanto sembrano evidenziare l'importanza del coinvolgimento endoteliale nelle fasi precoci di SSc. Se da una parte sembra che vi sia il coinvolgimento della cellula endoteliale nei meccanismi patogenetici della SSc, con parte rilevante nell'homing dei linfociti T, come dimostrato dall'espressione sulla loro superficie di diverse molecole di adesione (Grunshwitz MS et al., 1995), dall'altra gli eventi e le specifiche interazioni endoteliali che inducono l'abnorme e persistente stimolo alla sintesi fibroblastica devono ancora essere definiti. Una delle ipotesi più importanti vede coinvolta l'interazione endotelio-cellula immune con specifica regolazione degli infiltrati perivascolari e successiva attivazione fibroblastica immuno-mediata (Kahaleh MB, 1992).

Si è anche ipotizzato che il processo dell'apoptosi cellulare (o morte cellulare geneticamente programmata, che si verifica quando una cellula è danneggiata o comunque non più necessaria al sistema) sia, in corso di SSc, particolarmente attivato nelle cellule endoteliali e nei linfociti. Sembrerebbe invece inibito nei fibroblasti, dove

si è dimostrato un aumento del rapporto Bax:Bcl2, dovuto ad un abnorme *down-regulation* della proteina pro-apoptotica Bax (Santiago B et al., 2001) ed ad una *up-regulation* di Bcl2. Tale rapporto alterato farebbe emergere, nella SSc, una popolazione di fibroblasti resistenti all'apoptosi e potenzialmente indotti dal TGF- β (Jelaska A., 2000). A livello dei linfociti T CD4+ (*cluster of differentiation*) è stato dimostrato un aumento della proteina Bcl2 ma non della proteina Bax; nei linfociti T CD8+ si è riscontrato un aumento del recettore Fas (CD95) (Graninger Gh et al., 2000).

Nel 1996 Sgonc et al. hanno dimostrato, in biopsie cutanee della fase precoce di malattia, un abnorme numero di cellule endoteliali in apoptosi (Sgonc R. et al., 1996). Questo elemento è stato attribuito alla presenza in circolo di anticorpi antiendotelio (AECA), i quali indurrebbero l'adesione dei leucociti all'endotelio (Carvalho D. et al., 1996) e poi l'apoptosi (Bordron A. et al., 1998).

Pertanto risulta evidente come l'apoptosi cellulare rappresenti un evento chiave nella patogenesi della SSc e probabilmente il *primum movens* della malattia, seguita poi dall'infiltrazione delle cellule mononucleate, quindi dalla fibrosi.

1.3.1. Il danno vascolare

Si pensa che gli eventi iniziali della patogenesi della SSc siano da localizzare a livello dei capillari e dei piccoli vasi (D'Angelo WA et al., 1969; Cannon PJ et al., 1974). Infatti la dimostrazione istopatologica di danno vascolare è presente prima del danno fibrotico e manifestazioni cliniche di danno vascolare, come il FR, precedono tutti gli altri disturbi. Inizialmente si ha un danno a carico della cellula endoteliale seguito da un ispessimento dell'intima e da un progressivo restringimento del lume fino alla completa ostruzione del vaso (Flavahan NA, 2003). Con il progredire del danno vascolare, la diminuzione del letto microvascolare della cute e degli altri organi colpiti, causa uno stato di ischemia cronica.

Le cellule endoteliali svolgono un ruolo attivo nella patogenesi della SSc (Kahaleh BM et al., 1992). Ancora prima dello sviluppo di un danno vascolare è possibile identificare un incremento delle molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali; a loro volta l'adesione dei linfociti e la loro attivazione comporta rilascio di citochine in grado di attivare le cellule endoteliali. Si crea in questo modo un circolo vizioso le cui conseguenze incidono profondamente sulle funzioni dell'endotelio e sul mantenimento della patologia vascolare (Kahaleh BM, 1994)

La cellula endoteliale è deputata a separare il contenuto vasale dallo spazio interstiziale, prevenire l'aggregazione piastrinica, inibire la cascata della coagulazione e modulare lo stato contrattile delle cellule muscolari lisce (tono vasale). Nello svolgimento di questi compiti, la cellula endoteliale produce e secerne varie sostanze, alcune attive sulla muscolatura liscia vasale quali nitrossido (NO) - a spiccata azione vasodilatante -, ed endotelina-1 (ET-1) - potente vasocostrittore -; altre con azione sulla funzionalità piastrinica quali la prostaciclina, che impedisce l'aggregazione delle piastrine e la loro interazione con il connettivo subendoteliale, o il trombossano (TXA₂) che possiede, invece, caratteristiche funzionali opposte. Il danno endoteliale nella SSc è ben documentato non soltanto dalla proliferazione intimale dei vasi arteriolari, ma anche dall'incremento sierico del fattore VIII di von Willebrand (Kahaleh MB et al., 1981) e della ET-1. Comporta anche l'espressione di molecole di adesione (VCAM-1 "vascular cell adhesion molecole 1", ICAM-1 "intercellular adhesion molecole 1", selectine) che legano cellule immuni, soprattutto T linfociti, favorendone il passaggio nei tessuti (Gruschwitz K. et al, 1995). Lo stesso danno può inoltre determinare aggregazione piastrinica, con formazione di microtrombi e conseguenti lesioni ischemiche. Le piastrine attivate liberano citochine che richiamano ed attivano i fibroblasti, con conseguente eccessiva produzione di collagene, ed anche mediatori quali l'endotelina che scatenano localmente fenomeni di vasospasmo. La formazione di microtrombi ed i ripetuti episodi raynaudiani sono causa di ischemia e quindi di

degenerazione e necrosi tissutale. Per quanto riguarda le *piastrine*, la cui attivazione è molto probabilmente secondaria alle alterazioni dell'endotelio, in circolo esse si presentano maggiormente aggregate rispetto ai soggetti normali e dotate di un più elevato contenuto di granuli, contenenti β -tromboglobulina (Kahaleh et al., 1982), peptidi dell'attivazione del tessuto connettivo (CTAPs), fattore piastrinico 4 (FP-4), trombospondina, fattori d'attivazione fibroblastica, transforming growth factor β (TGF- β) e platelet derived growth factor (PDGF), ciascuno capace di modificare lo stato delle cellule endoteliali, dei fibroblasti e delle cellule immunitarie.

Attraverso la capillaroscopia si può dimostrare il danno capillare a livello del letto ungueale (Maricq HR e Le Roy EC, 1973); gli studi con immunofluorescenza mostrano invece gli anticorpi diretti verso la laminina ed il collagene di tipo IV (che con i proteoglicani condroeparin-solfati sono i costituenti principali della membrana basale) (Fleischmaier R. et al., 1976). Anche le piccole arterie, oltre ai capillari, mostrano alcune alterazioni come l'ispessimento della media e dell'intima, degenerazione ialina o fibrinoide e la deposizione subintimale di collagene. È per questo motivo che la vasculopatia in corso di SSc può essere considerata sia di tipo distruttivo (conduce alla perdita dei capillari) che proliferativo (porta all'ipertrofia dell'intima della media e dell'avventizia). La vasculopatia proliferativa è mediata da molti fattori che hanno in comune le capacità proliferative e vasocostrittrici: diminuisce la produzione di NO (che ha spiccata azione vasodilatante), si riduce il rilascio di prostaciclina (anch'essa vasodilatante) ed aumentano i livelli di ET (potente vasocostrittore). La vasculopatia distruttiva è caratterizzata dall'aumentata apoptosi delle cellule endoteliali, non compensata dall'angiogenesi e vasculogenesi, che invece sono ridotte, probabilmente a causa di un'alterata espressione dei fattori angiogenetici. Al culmine della vasculopatia distruttiva si ha un'assoluta assenza di vasi sanguigni, con ipossia tissutale e fenomeni ischemici (Distler O. et al., 2004; Davies CA, 2006; Distler O., 2010).

Il danno vascolare si manifesta quindi con una triade caratteristica:

1. Instabilità vasomotoria generalizzata e tendenza al vasospasmo; da un punto di vista clinico sono rappresentate dal FR, caratterizzato da ripetute interruzioni transitorie della perfusione tissutale nelle dita e negli organi interni (FR sistemico), che spesso è un evento precoce nello sviluppo della malattia. In questi pazienti si ha un aumento dei livelli di ET-1, i livelli circolanti di NO sono invece ridotti e non aumentano nemmeno in risposta al raffreddamento (Kahaleh BM,1991; Kahaleh BM et al., 1993). Il TXA2, potente agente vasocostrittore, appare invece aumentato nei pazienti con SSc, e i suoi livelli si alzano dopo l'applicazione di uno stimolo freddo (Reilly IAG et al., 1986).
2. Alterazioni microvascolari con modificazioni strutturali, caratterizzate da proliferazione dell'intima arteriolare ed obliterazione del lume vascolare con conseguente ischemia cronica.
3. Manifestazioni patologiche intravascolari come: aumentata attività delle piastrine, ridotta deformabilità dei globuli rossi ed esaltata formazione di trombi, alla base della quale ci sarebbe anche un'attivazione dei polimorfonucleati che possono ostruire il lume del vaso e rilasciare i radicali liberi dell'ossigeno (Lau CS et al., 1992).

Questo può giustificare l'ipotesi che nei pazienti con SSc vi sia uno squilibrio tra fattori vasocostrittori e vasodilatanti, soprattutto quelli di origine endoteliale, che possono condurre ad uno stato di vasospasmo che dà luogo al FR.

1.3.2. Il danno fibrotico

Nel paziente sclerodermico si ha un'eccessiva deposizione di matrice extracellulare (ECM), per un'aumentata biosintesi più che per un ridotto catabolismo, sebbene l'attività delle procollagenasi cutanee sia anch'essa elevata (Uitto K et al., 1992). La ECM, che si localizza nell'intima dei vasi e nello spazio pericapillare e interstiziale della cute, rene, cuore, polmone e tratto gastrointestinale, è prodotta dai fibroblasti, che

nella SSc, secernono una quantità di collagene tre volte superiore alla norma. Le forme di collagene maggiormente prodotte in corso di SSc sono il tipo I, III (presente soprattutto a livello del derma reticolare delle lesioni di più recente insorgenza) e VI (perivascolare) e presenta similitudini ultrastrutturali con quello che si riscontra nelle recenti ferite in via di guarigione. Inoltre i fibroblasti presentano un cosiddetto “fenotipo sclerodermico”, caratterizzato da un aumento dei livelli dell’ mRNA per il procollagene, come dimostrato da studi *in vivo* e *in vitro* (Jimenez S et al., 1996) di mRNA per la fibronectina e dall’aumentata sintesi di glicosaminoglicani (GAG).

Si è rilevato anche un’aumentata attività di fattori che regolano la trascrizione del procollagene $\alpha 2(I)$ (COL1A2) (Boast et al., 1990). I fibroblasti coinvolti sono inoltre iporesponsivi al PDGF, ma aumentano l’espressione di recettori per il PDGF-AA (PDGF- α) dopo contatto col TGF e presentano anche un legame con un maggior numero di linfociti, perché sulla loro superficie aumenta l’espressione della molecola di adesione ICAM-1.

Un’ultima caratteristica è rappresentata dal fatto che i fibroblasti sembrano essere in uno stato di persistente attivazione, probabilmente per alterazioni epigenetiche, che si esprime con una proliferazione esagerata ed un aumento della secrezione di costituenti della ECM. L’accumulo progressivo di tessuto connettivo conduce ad un sovvertimento della normale architettura degli organi coinvolti con conseguente alterazione o perdita della loro funzione.

È per questo che la fibrosi a carico della cute, del cuore, dei polmoni e degli organi del tratto gastrointestinale aumenta la morbilità e la mortalità (Varga J 2010).

1.3.3. L’attivazione del sistema immunitario

Le alterazioni immunologiche in corso di SSc sono a carico di entrambe le componenti, umorale e cellulare.

1.3.3.1. Immunità umorale

Nella SSc si riscontrano alterazioni aspecifiche, che comprendono ipergammaglobulinemia policlonale, crioglobulinemia, positività del fattore reumatoide del test VDRL (false-positive Venereal Research Laboratory). Il 95% dei pazienti presenta anticorpi (Ac) antinucleari (ANA), a prevalente pattern nucleolare all'immunofluorescenza diretta, suddivisibili in sottotipi specifici per la forma diffusa (anti topoisomerasi I, o Scl-70, nel 30-40% dei casi e associati ad un rapido coinvolgimento cutaneo, polmonare e renale) e per la forma limitata (anti centromero nel 40% dei soggetti affetti). Inoltre possono ritrovarsi anche altri tipi anticorpali, sebbene in minor percentuale (Tabella 1.5).

Autoanticorpi anticentromero (ACA): sono presenti circa nel 99% dei pazienti con sindrome CREST (forma limitata) ma possono essere riscontrati anche in pazienti con sindrome di Sjogren o con SSc diffusa, oppure in quelli in cui il FR è associato ad artrite reumatoide o tiroidite di Hashimoto. Poiché gli ACA sono frequentemente associati con la sindrome CREST essi possono risultare predittivi di buona prognosi benché vada sottolineato che la sindrome CREST può essere associata a due gravi complicanze, la cirrosi biliare e l'ipertensione polmonare.

Scl-70: questi autoanticorpi sono frequentemente associati alla forma diffusa della malattia. L'antigene corrispondente è stato identificato come l'enzima nucleare DNA topoisomerasi che regola il superavvolgimento dei cromosomi durante il ciclo cellulare. Gli Scl-70 sono considerati un marker della sclerosi sistemica, soprattutto nelle forme ad esteso coinvolgimento cutaneo e associate ad ipertensione polmonare.

Anticorpi nucleolari: sono presenti in circa il 50% dei pazienti con SSc e ne sono stati identificati 4 differenti sottotipi associati con forme più o meno estese della malattia.

Autoanticorpi anti-recettore-Fcy: sono presenti nel siero di pazienti con LES, sindrome di Sjogren e SSc (50). I recettori Fcy sono membri della superfamiglia delle immunoglobuline e sono presenti in molte cellule compresi i macrofagi, cellule natural

killer (NK), monociti, neutrofili, piastrine e linfociti B. Il recettore Fcγ è specifico per le IgG e gioca un ruolo importante nella rimozione di complessi immuni dal circolo. Inoltre quando questi autoanticorpi si legano ai ligandi stimolano le cellule al rilascio di varie citochine e prostaglandine. E' stato recentemente dimostrato che circa il 66% dei pazienti con forma diffusa e circa il 32% con forma limitata della malattia presentano anticorpi circolanti contro il recettore Fcγ (Davis K., et al., 1995). La presenza di questi anticorpi non correla con la durata della malattia, le caratteristiche cliniche e gli altri dati di laboratorio. Essi pertanto, non sono considerati marker della SSc (Sapadin AN et al, 2001).

Tabella 1.5 – Autoanticorpi rilevabili in corso di sclerosi sistemica		
AUTOANTICORPI	FORME DI SSc	FREQUENZA
1. Ac antinucleo (ANA)	Entrambe	95 %
2. Anticentromero (ACA)	Limitata	60 – 80 %
3. Antitopoisomerasi I (Scl-70): anticorpi diretti contro l'enzima nucleare topoisomerasi I	Diffusa	40 %
4. Antinucleolari, diretti contro diverse componenti nucleolari e tRNA sintetasi:		
> RNA polimerasi I, II, III		
> Fibrillina (U3 RNA protein complex)	Diffusa	5 – 40 %
> RNA nucleolare 4-65		
> U1RNA protein complex	Diffusa	5 – 45 %
> TH nucleolare	Limitata	5 – 35 %
> SS-B/LA e SS-A/Ro	Limitata	14 %

<p style="text-align: center;">> Th0-Th1 RNP</p> <p>5. Anticorpi diretti contro proteine della matrice extracellulare</p> <p>6. Ku e PM/Scl</p>	SSc con polimiosite	25 %
--	---------------------	------

Come gli Ac siano coinvolti nella patogenesi della SSc è ancora ignoto, ma l'opinione corrente è che essi siano indotti dal danno endoteliale. Uno studio ha dimostrato che gli ANA sono capaci di determinare una citotossicità anticorpo-dipendente (ADCC) a carico delle cellule microvascolari umane sane (Mark M. et al., 1988). Gli ANA possono inoltre modulare a livello genico l'attività delle regioni promoter, dei fattori di transattivazione e di replicazione cellulare. Non è emerso chiaramente il ruolo che svolgono gli Ac rivolti contro il collagene di tipo I, III, IV e VI, benché sia stata dimostrata un'associazione tra la severità del coinvolgimento polmonare e Ac anticollagene IV (Mackel et al., 1982).

Recentemente un gruppo di ricercatori ha correlato la comparsa di ischemia vascolare, comune nei pazienti con SSc, alla produzione di frammenti immunogenici di proteine (Casciola-Rosen L et al, 1997). La ricerca degli eventi associati con ripetuti stress e danno al circolo vascolare periferico che possono essere associati a eventi immunospecifici nei pazienti con SSc rappresenta la base di questa teoria. Si pensa che in condizioni ischemiche alcune proteine associate ai tessuti vascolari possano essere danneggiate da radicali liberi dell'ossigeno. È stato osservato che le proteine secrete dalle cellule endoteliali coltivate in presenza di alte concentrazioni di alcuni ioni metallici erano suscettibili ad un peculiare clivaggio metallo-catalizzato. I prodotti di questa degradazione sono riconosciuti dagli anticorpi diretti contro Scl-70 e le riboproteinasi, anticorpi associati specificamente con la SSc (Vazquez-Abad D et al, 1995). È stato ipotizzato che la generazione di questi prodotti in vivo possa alterare

proteine del *self* in grado di indurre una risposta immunitaria, rappresentando quindi il legame tra la comune comparsa clinica di ripetuti eventi ischemici e l'attivazione immunitaria.

1.3.3.2. Immunità cellulare

La presenza di infiltrati cellulari mononucleari, l'alterata funzione dei monociti e delle cellule T-helper, la ridotta attività delle cellule natural killer, il rilascio di vari tipi di citochine e la presenza di autoantigeni corrispondenti a componenti del tessuto connettivo, sono tutti elementi che suggeriscono il ruolo importante dell'immunità cellulare nella patogenesi della SSc (Postlethwaite AE, 1990). È in questo contesto che le molecole di adesione svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della reazione flogistica. Infatti tali molecole, che si trovano su cellule endoteliali, linfociti e fibroblasti sono i mediatori delle interazioni tra le cellule e tra cellule e matrice. L'aberrante espressione di queste molecole può spiegare, almeno in parte, il reclutamento di linfociti attivati nei tessuti affetti.

Le molecole di adesione sono state raggruppate in tre famiglie principali:

- 1 le selectine,
- 2 le integrine,
- 3 i membri della superfamiglia delle immunoglobuline.

Nella SSc ogni famiglia risulta iper-espressa, probabilmente perché le cellule che producono queste molecole risultano molto più attive.

a *Selectine*: mediano il primo contatto dei leucociti con le cellule endoteliali. La loro espressione fa rapidamente seguito alla stimolazione dell'endotelio da parte dei leucociti. L'espressione della E-selectina risulta aumentata nella cute e nelle ghiandole salivari minori di pazienti con SSc e nel siero di questi soggetti si ritrova un aumentato livello delle E-selectina e delle P-selectina solubili (Gruschwitz MS et al., 1995).

b *Integrine*: sono delle molecole glicoproteiche eterodimeriche riunite in una subunità α ed in una β ; hanno importante ruolo di comunicazione tra le molecole della ECM (collagene, laminino, fibronectina, vitronectina) ed il compartimento extracellulare attraverso la membrana. La loro espressione è aumentata nelle cellule endoteliali, in quelle dendritiche, negli infiltrati mononucleati e nei fibroblasti della cute dei pazienti con SSc.

c *Superfamiglia delle immunoglobuline*: fanno parte di questo gruppo le molecole di adesione intracellulare (ICAM-1) e le molecole di adesione vascolare (VCAM-1). Le ICAM-1 si trovano sulla superficie cellulare, sia delle cellule endoteliali che dei fibroblasti; le VCAM-1 sono localizzate solo sulle cellule endoteliali. Queste molecole sono importanti nell'interazione tra linfociti e cellule endoteliali o fibroblasti. Nella SSc l'espressione delle ICAM-1 è aumentata sia nelle cellule endoteliali che nei fibroblasti (Postlethwaite AE, 1990); mentre quella di VCAM-1 lo è solo a livello dell'endotelio (Grunschwitz MS et al., 1995).

Linfociti

Molti sono gli studi sui linfociti T del sangue periferico in corso di SSc, ma ancora le informazioni sulle specifiche sottopopolazioni linfocitarie T o sulle funzioni di questi linfociti nelle sedi di malattia sono ancora parziali.

Nei pazienti con SSc si ha una linfopenia assoluta, il rapporto tra T e B è conservato, ma i T helper-inducer prevalgono sui T suppressor. Il fenotipo linfocitario Th, insieme ad altre cellule della flogosi infiltra la cute nelle fasi precoci di malattia (Roumm et al., 1984). Nella progressione della patologia gli elementi T helper-inducer comprendono sia i sottotipi CD4+ che CD8+. Nella cute la sottopopolazione helper CD4+ predomina, invece nel liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) contiene prevalentemente cellule T CD8+ (White B., 1996).

Possiamo differenziare i linfociti T, oltre che sulla base dell'espressione di recettori di superficie (come gli antigeni CD4 e CD8), anche a seconda della produzione di fattori

solubili. I linfociti T helper (Th) si possono distinguere in tipo 1 (Th1) e 2 (Th2): le cellule Th1 producono l'interleuchina-2 (IL-2) e l'interferon- γ (IFN- γ); le cellule Th2 producono IL-4, IL-5 ed IL-10. Tuttavia questa distinzione non appare sempre così netta. Un profilo citochimico di tipo Th2 con produzione aumentata di IL-4 e ridotta di IFN- γ è stato documentato nei linfociti T isolati dal sangue e dal BAL dei pazienti con SSc (Needleman BW et al., 1992). I linfociti T clonati dalla cute di pazienti con SSc differiscono dalle cellule clonate dal sangue periferico nel profilo di citochine prodotte, tanto che si ritiene che le cellule circolanti rappresentino un'immagine al negativo della popolazione di cellule mononucleate intralesionali. La maggior parte dei cloni di derivazione cutanea è di tipo CD4+ e produce IFN- γ e/o il fattore stimolante i glicosaminoglicani in presenza del fitogeno concanavalina A (Ferrarini M. et al., 1990). Il profilo delle citochine prodotte è di tipo informativo, tuttavia ulteriori studi sono necessari per correlare il fenotipo funzionale delle cellule immunitarie presente a livello locale con l'espressione di malattia.

I linfociti T possono essere caratterizzati anche dall'espressione di recettori di membrana, denominati recettori per l'antigene dei linfociti T (TCR, T Cell Receptor) che appartengono alla superfamiglia del gene delle immunoglobuline. I TCR sono riarrangiati in diverse sotto-componenti, che i linfociti T possano essere classificati sulla base del loro TCR in due tipi: attraverso l'espressione di sottofamiglie dei prodotti del gene della regione variabile o mediante l'analisi della regione ipervariabile. Nella SSc ci sono pochissimi studi sull'espressione dei linfociti T con recettore γ/δ della cute e su una sottopopolazione di linfociti T α/β all'interno della popolazione CD8+ nel fluido broncoalveolare di pazienti con SSc.

I linfociti possono essere dettagliati in modo più specifico con l'analisi dettagliata della regione ipervariabile del TCR. I TCR subiscono un riarrangiamento genetico dei loro elementi costitutivi (variabile, di diversità, giunzionale, delle regioni costanti nella catena β e variabile, giunzionale, delle regioni costanti nella catena α) tanto che le

cellule T possono essere guidate sotto stimolo antigenico così come di derivazione clonale basandosi sull'analisi molecolare della regione ipervariabile della proteina. L'uso dei geni della regione variabile e i riarrangiamenti clonali delle regioni ipervariabili sono indicativi di linfociti T reattivi ad un antigene. Queste cellule sono state rilevate nel sangue periferico, nei tessuti e nei polmoni di pazienti con SSc. Due tipi di cellule descritte nei pazienti con SSc sono linfociti T con regioni variabili γ/δ , in particolare $V\delta 1$ nel sangue periferico e nei tessuti e cellule $CD8+$ nel polmone (Yurovsky W et al., 1994; Yurovsky W. Et al., 1996). Linee cellulari T derivate dal fronte di avanzamento della cute lesa nei pazienti con SSc sono state espansse in coltura e analizzate per l'espressione del gene variabile e clonotipizzate. In tre di quattro pazienti esaminati, l'espressione dei geni $V\delta$ è stata rilevata con tecniche molecolari e con indagini di colorazione delle membrane cellulari. L'analisi sequenziale molecolare dei prodotti genici con reazione polimerasica a catena (PCR, Polimerase Chain Reaction) ha confermato che simili clonotipi erano presenti in due di tre pazienti esaminati (Toth R et al., 1995).

Di recente Lunardi et al. hanno dimostrato che nella SSc è presente sia un peptide immunodominante con elevata omologia con la proteina UL94 del CMV, sia un'elevata quantità di anticorpi anti-CMV umano in grado di indurre l'apoptosi endoteliale (Lunardi C et al., 2000). Questa evidenza riporta l'interesse verso il concetto di Mimicria Molecolare e più in generale verso la specificità della risposta immunitaria, sia umorale che cellulare. Il termine "mimicria molecolare" indica che ci possono essere alcuni epitopi in comune tra epitopi antigenici *self* e *non self*, così che si avrebbe la formazione di Ac cross-reagenti con proteine cellulari dell'ospite. La mimicria molecolare è oggi considerata come un possibile meccanismo per la genesi delle malattie autoimmuni. La forma diffusa della SSc è caratterizzata per la presenza di anticorpi anti-topoisomerasi I, enzima nucleare che media l'apertura dell'elica del DNA, permettendone la sua replicazione, ricombinazione e trascrizione cellulare. Nella

SSc si pone il problema se la risposta autoimmune possa modificarsi nel tempo. Recentemente è stato indagato il dominio di riconoscimento dell'anticorpo anti topoisomerasi I in una serie di pazienti SSc positivi allo scleroderma 70, prodotto di degradazione della topoisomerasi I (Henry PA et al., 2000). I sieri sono stati testati con *immunoblotting* per reattività IgM, IgG, IgA, k e l allo scleroderma 70 nonché con 8 frammenti di peptide ricombinante della molecola di topoisomerasi I. Questo studio permette di indagare se la mimicria molecolare possa essere un evento induttore la genesi di anticorpi anti topoisomerasi I e se il riconoscimento di epitopi da parte di linfociti B possa modificarsi nel tempo, soprattutto nella fase avanzata di malattia indicando la continua presenza di un antigene. I risultati mostrano come gli anticorpi antitopoisomerasi IgM, IgG, k e l possano riconoscere, sia in fase precoce che tardiva, la molecola dello scleroderma 70 più che gli altri 8 peptidi topoisomerasi I. Inoltre i livelli di anticorpi primari e secondari contro la topoisomerasi I si modificavano nel corso del tempo ed addirittura aumentavano nella fase avanzata della malattia. Questi dati suggeriscono che la mimicria molecolare abbia un ruolo nell'induzione del processo autoimmune nella SSc e che la presentazione di epitopi antigenici sconosciuti abbia luogo anche nella fase fibrotica della malattia, quando si ritiene che la malattia sia ormai spenta. Per quanto concerne la risposta cellulo-mediata negli ultimi anni si sono evidenziati due aspetti che caratterizzano la risposta dei linfociti T: la produzione di pattern specifici di citochine e la restrizione clonale del recettore per l'antigene dei linfociti T. Si è visto, infatti, che la produzione di citochine è polarizzata in senso Th2 (IL-4, TGF- β), con caratteristiche endotelio-tossiche e pro-fibrotiche (Abe R et al., 2001). Riguardo alla restrizione del TCR, negli ultimi anni si è visto come i linfociti TCR γ/δ siano ristretti clonalmente, infiltrino la cute malata, siano specificatamente citotossici per l'endotelio e producano un pattern citochinico specifico di tipo Th1, sostenendo l'atteggiamento aggressivo di questa filiera cellulare (Giacomelli R. et al., 2002; Giacomelli R et al., 1998).

Malattia cronica del trapianto verso l'ospite (cGVHD "chronic Graft Versus Host Diseases")

Un approccio per migliorare le nostre conoscenze sulla SSc è stato quello di intensificare gli studi sulla cGVHD (Sullivan G et al, 1994). Diversi pazienti che ricevono un trapianto allogenico di midollo osseo sviluppano cGVHD nella quale cellule immunocompetenti del donatore sono attivate in risposta agli antigeni dell'ospite (Beatty PG, 1997). Diversi di questi pazienti sviluppano una sindrome clinica simile alla SSc, con decorso clinico cronico, debilitante e progressivo, caratterizzato da fibrosi della cute e del polmone e da contratture articolari, preceduto da infiltrato di cellule immunitarie negli organi affetti. Un processo simile avviene nei pazienti che ricevono emotrasfusioni da donatori correlati con i quali condividono compatibilità per alcuni antigeni HLA (McMilin KD et al., 1993). Sono state sviluppate in questo campo due linee di ricerca:

- a. studio dei modelli murini di cGVHD (Claman HN, 1990);
- b. è stata avanzata l'ipotesi che il trasferimento bidirezionale di cellule fetali e materne possa essere associato con lo sviluppo di cGVHD in pazienti con SSc.

Un articolo che descrive diversi modelli animali impiegati per studiare i meccanismi patogenetici associati alla SSc è stato pubblicato recentemente (Jimenez SA et al., 1996). Sebbene non vi sia un modello animale che presenti tutti i segni clinici e le modificazioni istologiche che si osservano nella malattia dell'uomo, diversi aspetti patologici comuni possono fornire le basi per chiarire i meccanismi patofisiologici. Un modello animale che è stato estensivamente studiato da Jaffe e Claman (Jaffe BD, 1983) è quello murino. Il rationale di questo approccio è che i pazienti che esprimono una GVHD mostrano modificazioni che sono simili a quelle osservate nei pazienti con SSc, sebbene vi siano chiaramente delle differenze. Nel loro incrocio di ceppi murini, i due autori hanno rilevato modificazioni cutanee comprendenti aumentato deposito di

collagene, infiltrato di cellule mononucleari nel derma, perdita del tessuto adiposo dermico e degli annessi cutanei, modificazioni tutte associate alla SSc. La cGVHD era scatenata dalla iniezione di cellule mononucleari in recipienti allogenici irradiati nei quali la reazione GVHD è diretta principalmente verso antigeni minori. Altri incroci di ceppi murini sono stati impiegati per l'induzione di cGVHD; di questi il più affidabile conseguiva alla somministrazione di cellule da alcuni ceppi parentali iniettati nella progenie F1 (Mann RA et al., 1995). Un incrocio di ceppi parentale-F1 porta a GVHD acuto e la possibilità di identificare fini differenze tra malattia acuta e cronica ha portato all'identificazione dei loci genetici (Bradley DS et al., 1994), delle citochine coinvolte (Cleveland MG et al, 1987;; Sykes M et al., 1995) e delle vie regolatorie dei linfociti T (Mann RA et al, 1995) nella cGVHD che possono essere importanti per comprendere la SSc.

E' stato recentemente ipotizzato che la SSc possa essere una forma parziale di cGVHD. Questa ipotesi è stata proposta sulla base di una serie di osservazioni nelle quali cellule fetali venivano rilevate nella circolazione materna durante la gravidanza e molti anni dopo (Herzenberg LA et al., 1979). Nell'ultimo quinquennio è stata proposta una nuova teoria che caratterizza la maggior parte degli studi patogenetici condotti negli anni a cavallo con il millennio, il **Microchimerismo**. Questa si basa sul fatto che un certo numero di cellule geneticamente diverse da quelle dell'ospite si concentra nell'organismo di un essere vivente. Ciò può avvenire con diverse modalità, dal trapianto di un organo nell'ospite ad un processo fisiologico come la gravidanza. In quest'ultima, cellule del figlio possono attraversare la placenta, persistere nella circolazione materna per molti anni (Bianchi DW et al., 1996) e localizzarsi anche nei tessuti. Questo fenomeno è permesso grazie al particolare stato di tolleranza placentare nei riguardi del feto che ha ricevuto da parte del padre il 50% del proprio corredo genetico. La placenta in tal modo non esprime antigeni di classe I o II impedendo così che vi sia una stimolazione da parte della madre di cellule con

potenziale citotossico che indurrebbero un rigetto del feto e di conseguenza un aborto. La SSc colpisce in maniera prevalente il sesso femminile ed in particolare le donne che hanno concepito in precedenza un figlio. Ciò ha fatto credere che la gravidanza potesse avere un ruolo nella genesi della malattia. La prima dimostrazione del fenomeno è avvenuta nel 1996 da parte di Dana Bianchi et al. che mostrava la presenza di cellule fetali maschili in una donna sana a 27 anni di distanza dal parto. A seguito di questa osservazione veniva elaborata da Lee Nelson la teoria secondo la quale queste cellule potevano essere coinvolte in una reazione simile a quella che si riscontra nella malattia del cGVHD che ricorda la SSc, in particolare nel coinvolgimento della cute e del polmone (Nelson JL, 1996) . Nel 1998 Artlet e coll. hanno dimostrato la presenza di cellule fetali nei tessuti di donne affette da SSc dato confermato quest'anno anche dal gruppo di Lee Nelson (Artlet CM et al., 1998; Johnson KL et al., 2001). Ciò suggerisce quindi che le cellule microchimeriche, in seguito ad un evento ancora sconosciuto ma che alcuni indicano in una infezione, possano indurre una reazione immune che scatenerrebbe una catena di eventi tale da innescare la malattia.

Il riscontro di cellule di lunga vita (e rigenerantisi) del prodotto del concepimento è stato rilevato in donne anche a distanza di 27 anni dal parto (Bianchi DW et al, 1996). È stato ipotizzato che queste cellule possano essere coinvolte in una reazione cGVHD di basso grado (Nelson JL, 1996). Nella maggior parte dei lavori, cellule del prodotto del concepimento sono state riscontrate in donne che hanno partorito figli di sesso maschile nelle quali erano rilevabili antigeni associati al sesso maschile. È stato riportato che le cellule materne possano entrare nella circolazione fetale ed è stato recentemente ipotizzato che una loro progenie a lunga emivita possa essere associata con la comparsa di SSc nella vita adulta e rappresenti quindi la base della malattia nell'uomo e nelle donne che non hanno avuto gravidanze (Lo YM et al, 1996; Hutchinson DL et al, 1971). Un'analisi preliminare degli antigeni HLA materni e del prodotto del concepimento in un piccolo numero di pazienti con SSc ha mostrato che i

figli di madri con SSc hanno una maggiore compatibilità nel complesso maggiore di istocompatibilità (MHC “Major Histocompatibility Complex”) rispetto alle donne con microchimerismo senza malattia; la compatibilità MHC è significativamente associata alla SSc (Nelson JL, et al, 1997).

Macrofagi

Queste cellule multifunzionali sono probabilmente importanti nella genesi della malattia data la loro capacità d’influenzare altri tipi cellulari. Macrofagi alveolari di soggetti con SSc sintetizzano fibronectina in maggior quantità rispetto al normale: queste sono cellule attivate, capaci anche di produrre TGF- β , PDGF, TNF (Tumor Necrosis Factor), IL-1 β , IL-6, proteasi e altri mediatori solubili che possono essere importanti nella patogenesi della SSc. Esperimenti compiuti su macrofagi peritoneali murini hanno, inoltre, dimostrato che quando fatte crescere *in vitro* per lunghi periodi, tali cellule acquisiscono la capacità di sintetizzare collagene (Vaage V et al, 1990), supportando così l’ipotesi che, oltre a contribuire in maniera indiretta alla fibrosi, tramite la sintesi e il rilascio di fibronectina, i macrofagi possano avere un ruolo diretto nella produzione della ECM in corso di SSc.

Mastociti

A livello delle lesioni i mastociti si localizzano vicino ai vasi sanguigni, alla cui lesione possono contribuire col rilascio di triptasi, potente endopeptidasi capace di ledere le cellule endoteliali e di attivare la produzione di TGF β , e d’istamina, sostanza in grado di stimolare la proliferazione e la sintesi di matrice fibroblastica, e di causare la retrazione delle cellule endoteliali. I mastociti sono fortemente presenti *in vivo* nella GVHD, nella fibrosi polmonare interstiziale, nonché a livello dermico nelle lesioni sclerodermiche. Il siero di pazienti affetti da SSc contiene elevate quantità della proteina eosinofila cationica, derivata dalla degranolazione dei mastociti (Gustaffson GT et al, 1991).

E' interessante ricordare che l'utilizzo di bloccanti farmacologici della degranulazione, quali il sodio cromoglicato o il chetotifene, sulla cute sclerotica di topi ne riduce la fibrosi.

Le citochine

E' stato ipotizzato che a seguito dell'attivazione dei linfociti e monociti da parte di un antigene sconosciuto, numerose citochine vengano rilasciate nei tessuti ed in circolo. Esse possono indurre danno endoteliale e modulare il comportamento dei fibroblasti relativo alla proliferazione, chemiotassi, migrazione, e sintesi di elementi della matrice extracellulare. Ciò conduce alla massiva deposizione di tessuto connettivo neoformato, alla fibrosi e alla conseguente insufficienza d'organo. Le citochine che risultano alterate nel siero dei pazienti con SSc comprendono IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8; le IL-4, IL-6 e IL-8 sono state inoltre dimostrate nella cute sclerodermica. Sempre a livello cutaneo è anche possibile identificare diversi fattori di crescita tra cui il TGF- β , PDGF, CTGF, bFGF e l'endotelina-1.

Le alterazioni dell'immunità sia cellulare che umorale determinano uno squilibrio nella produzione citochinica che si manifesta con l'aumento di IL-2, IL-4, IL-6 e IL-8. In particolare, IL-2 e il suo recettore IL-2r sembrano essere lo specchio dell'attività di malattia e sembrano indicare il grado di coinvolgimento del sistema immunitario.

TGF- β : Il TGF- β , *in vitro*, stimola la sintesi dei componenti della ECM che includono il collagene di tipo I e III, i glicosaminoglicani e la fibronectina (Roberts A. et al., 1986; Varga J. et al., 1987). Inoltre promuove la fibrosi con l'aumento di sintesi degli inibitori della matrice metalloproteinasi (TIMPs) che inibiscono l'attività delle collagenasi (Kikuchi K. et al., 1997). Questi inibitori, infatti, sono aumentati nel siero dei soggetti affetti da SSc (Kikuchi K. et al., 1995). Inoltre il TGF- β induce una *up-regulation* dei recettori del PDGF- α , un altro fattore di crescita che conduce ad una proliferazione dei fibroblasti e alla sintesi di collagene. Il TGF- β è inoltre in grado di stimolare la

produzione di endotelina-1 da parte delle cellule endoteliali; questa è un potente agente vasocostrittore ed è in grado di stimolare a sua volta la produzione di collagene da parte dei fibroblasti.

Chemochine:

Le chemochine, secrete soprattutto dai leucociti, regolano il loro reclutamento nelle sedi di flogosi. Nella SSc i livelli sierici di MCP-1 (chemiotattico per monociti) e di MIP-1 α e β (chemiotattico per monociti e per cellule T-helper) sono elevati (Hasegawa M. et al., 1999). Il grande reclutamento di macrofagi ed il rilascio di citochine e fattori di crescita da parte di tali cellule è un possibile meccanismo con cui MCP-1 contribuirebbe alla fibrosi cutanea. La *up-regulation* del TGF- β , secreto dai macrofagi, può essere un mezzo indiretto con cui MCP-1 stimola la sintesi di collagene da parte di fibroblasti (Gharaee-Kermani M et al., 1996) mezzo indiretto attraverso il quale MCP-1 stimola la sintesi di collagene da parte dei fibroblasti.

1.4 MANIFESTAZIONI CLINICHE

1.4.1. Fenomeno di Raynaud

Come già detto in precedenza la SSc si può suddividere in una forma cutanea diffusa ed una forma limitata. La comparsa di manifestazioni cutanee nella SSc è generalmente preceduta o accompagnata dal Fenomeno di Raynaud (FR).

La *forma diffusa* è caratterizzata da un FR che spesso precede di circa un anno l'interessamento cutaneo, da ispessimento cutaneo diffuso, rapidamente progressivo che coinvolge le estremità distali o spesso prossimali ed il tronco, con alto rischio di grave e precoce coinvolgimento viscerale (polmonare, renale, miocardico) ed assenza di anticorpi anticentromero.

Nella *forma limitata* il FR può essere presente isolatamente per anni, l'ispessimento cutaneo è per lo più limitato alle estremità distali delle dita ed al viso, il coinvolgimento viscerale è frequente, ma molto più tardivo che nella diffusa ed è frequente la presenza di anticorpi anticentromero.

Normalmente l'esordio di malattia compare con FR, tumefazione delle dita (puffy fingers) o delle mani, poliartralgie o poliartriti che coinvolgono spesso le piccole articolazioni delle mani.

Il FR è una sindrome ischemica parossistica caratterizzata dalla comparsa di episodi acroasfittici a carico delle dita delle mani e, talvolta, dei piedi. Più raramente si presenta anche alla punta della lingua e del naso ed all'elice dell'orecchio. I sintomi riferiti dal paziente sono dolore, ottundimento della sensibilità ed alterazione del colore cutaneo (in successione: bianco, blu, rosso). I pazienti quando si espongono al freddo o al fumo di sigaretta o per fattori emozionali manifestano improvvisamente tale triade di sintomi con una progressione sempre costante (Rodnan GP et al, 1980; Maricq HR, 1986) (Figura 1.1).

Clinicamente si manifesta in tre fasi che si succedono:

1. la fase del pallore: corrisponde alla vasocostrizione dei vasi, con mancato afflusso di sangue e conseguente colorazione pallida-bianca della cute;
2. la fase della cianosi: corrisponde alla stasi venosa, con colorazione cianotica-bluastro della cute;
3. la fase dell'iperemia: rappresenta il ripristino del flusso sanguigno, la cute diventa rossastra.

Secondo la classificazione di LeRoy e Medsger (LeRoy EC Medsger TA Jr, 1992) si riconoscono due tipi di FR:

- FR primario quando è l'unica manifestazione clinica rilevante. Può infatti costituire l'unico elemento clinico della cosiddetta "Malattia di Raynaud" idiopatica e benigna. Di solito in questo caso la sintomatologia è simmetrica;

non si hanno necrosi tissutale, ulcere e gangrena. I capillari del letto ungueale risultano normali, gli ACA sono negativi e la velocità di sedimentazione degli eritrociti è normale. Assenza di cause secondarie in base alla storia clinica ed all'esame fisico generale del paziente.

- FR secondario se è associato a manifestazioni cliniche o sierologiche tipiche di una vasta gamma di patologie, comprendenti malattie autoimmuni, come la SSc, forme microtraumatiche, spesso lavorative, radicolopatie, neuropatie periferiche o malattie emolinfoproliferative. In questi casi si parla di "Sindrome di Raynaud". Il fenomeno può limitarsi agli arti superiori od inferiori, spesso è asimmetrico e può complicarsi con fenomeni ulcerativi o necrotici acrali

Inoltre nei pazienti affetti da SSc si può avere un **FR sistemico** nel quale i fenomeni vasospastici si presentano in tutti gli organi interni.

Nella forma limitata della SSc il FR è quasi sempre presente (95%), spesso precede le altre manifestazioni della SSc di anni o anche di decenni. Al contrario, il FR è presente all'esordio della forma diffusa soltanto nel 75% dei casi e precede solo di 1 anno le altre manifestazioni di malattia. (Wigley FM et al., 2010).



Figura 1.1 Fenomeno di Raynaud in paziente con edema digitale

1.4.2. Manifestazioni cutanee.

Manifestazione precoce della SSc è una tumefazione bilaterale e simmetrica delle dita delle mani o delle mani in toto, e talora dei piedi (**fase edematosa**). Dopo un periodo di tempo, variabile da poche settimane a diversi mesi, tale edema viene sostituito da indurimento ed ispessimento della cute, che perde elasticità e diventa non più sollevabile in pliche (**fase sclerotica**). Infine la cute diventa assottigliata ed atrofica. Il processo fibroso colpisce anche le ghiandole sudoripare, con riduzione della loro funzione secretoria, ed i bulbi piliferi, con caduta dei peli e dei capelli. La sclerosi cutanea interessa selettivamente le mani, che vanno incontro ad una progressiva retrazione, con deformità irreversibili in flessione (“mani ad artiglio”). Le lesioni SSc interessano poi frequentemente la cute del volto, dando la tipica “faces sclerodermica”, amimica, che fa assomigliare molto fra loro i pazienti colpiti dalla malattia. Elementi caratteristici di questa “faces” sono le labbra sottili, la rima orale che si apre poco e che non si chiude completamente lasciando in parte scoperti i denti incisivi, il naso affilato, le rughe della fronte spianate.

Nella *forma diffusa* l'ispessimento cutaneo si diffonde rapidamente in senso centripeto; entro alcuni mesi può coinvolgere avambracci, braccia, viso ed infine il tronco, soprattutto il torace e l'addome.

I pazienti affetti dalla *forma limitata*, invece, spesso presentano ispessimento soltanto della cute delle dita o delle dita e della faccia, e talora delle mani e delle regioni più distali degli avambracci. Nell'ultima circostanza, la malattia può rimanere stabile per anni senza coinvolgimento di regioni cutanee più prossimali. In una minoranza di pazienti (circa il 2%) non si ha ispessimento cutaneo ma, soltanto coinvolgimento viscerale: è il caso della "*sclerosi sistemica sine scleroderma*" (Masi AT et al, 1980).

La tecnica che viene maggiormente utilizzata per valutare il grado di ispessimento e/o indurimento cutaneo è il "punteggio cutaneo modificato di Rodnan" (mRSS, modified Rodnan Skin Score). Con la palpazione si analizzano 17 aree del corpo ed ad esse è assegnato un punteggio dell'ispessimento cutaneo, basato sul giudizio dell'esaminatore, riferito ad una scala ordinaria a 4 punti (0=spessore normale, 1=leggero ispessimento, 2=moderato ispessimento, 3=severo ispessimento) (Black CM 1995; Clements PJ, 1995).

Tipiche sono anche le teleangectasie: piccole aree maculari o puntate di colorito violaceo, che appaiono su dita, volto, labbra e lingua. Si riscontrano per lo più nei pazienti con forma limitata (80% dei casi); tali manifestazioni divengono più evidenti nella seconda e terza decade di malattia.

La calcinosi sottocutanea (deposizione di cristalli di idrossiapatite) è una complicazione tardiva,

frequente soprattutto nella lcSSc (45%), e generalmente è circoscritta nelle sedi sottoposte a microtraumi, come dita, avambracci, gomiti e ginocchia. Recentemente la calcinosi è stata classificata in quattro classi morfologiche in base alla presentazione clinica (Sacu O, 2010). Altre lesioni cutanee molto comuni nella SSc sono le discromie,

chiazze iperpigmentate, talora molto estese, o più spesso ipopigmentate (Valentini G et al., 2008).

1.4.3. Alterazioni dell'apparato locomotore

Le poliartralgie coinvolgono sia le piccole che le grandi articolazioni, sono frequenti soprattutto nelle fasi precoci della SSc diffusa e più raramente sono presenti artriti. Si ha spesso un coinvolgimento tenosinoviale, con sindrome del tunnel carpale (STC) e rumori coriacei di sfregamento sui tendini estensori e flessori di dita, avambraccia, ginocchia, caviglie ed altre sedi, patognomonic di SSc ("tendon friction rubs"). Le flessioni in contrattura sono gravi soprattutto in soggetti con SSc diffusa.

Le alterazioni radiografiche possono essere sia articolari che extra-articolari. Nella maggioranza dei casi le sole anomalie sono rappresentate da atrofia diffusa e da osteopenia. Una forma di artrite erosiva, simile all'artrite reumatoide, è presente soltanto in una minoranza di pazienti (Schumacher HR,1973).

La maggioranza dei pazienti affetti da SSc presenta una diffusa atrofia muscolare da disuso per limitata mobilità articolare, secondaria al coinvolgimento di cute, articolazioni e tendini (Clements PJ, 1978). Più raramente sono presenti miositi.

1.4.4. Alterazioni dell'apparato gastroenterico

Il coinvolgimento dell'apparato gastroenterico si ha in circa l'80% (Marie I, 2006) dei pazienti sclerodermici e differisce poco fra i pazienti affetti da sottotipo diffuso e limitato, ed in particolare viene colpito per lo più l'esofago con una percentuale che varia dal 50 al 90% dei pazienti secondo le diverse casistiche. Il danno anatomopatologico provocato dalla SSc è simile in tutte le porzioni del tubo digerente: si assiste infatti ad una progressiva perdita della muscolatura liscia con conseguente fibrosi ed atrofia.

A livello esofageo le alterazioni vanno a collocarsi solitamente a livello dei due terzi distali del corpo esofageo e portano a disordini della peristalsi dell'organo. I disturbi motori che ne conseguono coinvolgono sia il corpo dell'esofago che il suo sfintere esofageo inferiore che in corso di SSc diventa ipotonico. La manometria (gold standard per lo studio esofageo) e la cineradiografia dimostrano una riduzione o scomparsa dell'attività peristaltica dei 2/3 inferiori dell'esofago e, in fasi avanzate di malattia, l'organo può risultare dilatato notevolmente. Tutto ciò conduce spesso ad un quadro di malattia da reflusso gastro-esofageo (GERD, "GastroEsophageal Reflux Disease") che dal punto di vista clinico può essere asintomatico, caratterizzato da sintomi tipici quali pirosi, rigurgito e disfagia per solidi e/o liquidi o da sintomi atipici come dolore retrosternale, disturbi respiratori (tosse cronica) e quadri otorinolaringoiatrici (laringiti, faringiti, otiti) (Poelmans J et al., 2005). Gli insulti acidi sulla mucosa esofagea possono portare ad una vera e propria esofagite, fino ad ulcerazione della mucosa. Nei pazienti sclerodermici un quadro cronico di GERD può condurre anche ad altre complicanze: può favorire l'insorgenza di stenosi esofagee; può causare anche un quadro di metaplasia della mucosa con l'insorgenza dell'esofago di Barret (BE), che è stato osservato nel 40% dei pazienti (Sallam H et al., 2006). Quindi i disturbi motori antecedono le alterazioni organiche cui va incontro l'esofago nella SSc. Uno studio manometrico dell'esofago effettuato da Roman S. e coll. suggerisce che il reflusso gastro-esofageo rappresenta la manifestazione clinica più frequente, infatti nel 68,6% dei pazienti sclerodermici vi è una vera e propria malattia da reflusso gastro-esofageo. (Roman S et al., 2010). Tuttavia sono riportati anche altri sintomi come nausea, gonfiore e diminuzione di peso, che suggeriscono il coinvolgimento di altre aree a livello gastrointestinale (Forbes A et al., 2009; Domsic R et al., 2008). Circa la metà dei pazienti sclerodermici lamenta un quadro sintomatologico, che potrebbe riflettere una compromissione gastrica, come sensazione di pienezza post-prandiale, sazietà precoce, gonfiore, nausea e dolore epigastrico (Szamosi S et al., 2006; Weston S et al., 1998).

Tuttavia, poichè il coinvolgimento esofageo in corso di SSc è spesso asintomatico, non è possibile basarsi solo sulla clinica per fare una diagnosi precoce delle complicanze della malattia a livello gastrointestinale, mancando una stretta associazione tra la presenza di una sintomatologia clinica ed il reale coinvolgimento dell'organo.

Infatti, sebbene i disordini motori siano presenti in quasi tutti i pazienti con sintomi clinici esofagei, le stesse alterazioni motorie a carico del viscere si riscontrano anche in soggetti del tutto asintomatici (Lahcene M. et al., 2009). Pertanto l'assenza di una sintomatologia non esclude necessariamente il coinvolgimento esofageo (Sallam H. et al., 2006) e d'altra parte le manifestazioni cliniche non risultano predittive né di disordini pressori a carico del SEI, né di alterazioni peristaltiche del corpo esofageo. Quello che potrebbe essere predittivo di un coinvolgimento esofageo in corso di SSc è il profilo anticorpale del paziente (Roman S. et al., 2010). Alcuni studi hanno mostrato come la presenza degli Ac anticentromero (ACA) possa essere protettiva nei confronti di un impegno viscerale, infatti gli stessi anticorpi risultano meno frequenti nei soggetti con SSc nella sua forma cutanea diffusa (Ferri C et al., 2002; Mayes M D et al., 2003; Ioannidis J P et al., 2005; Catoggio LJ et al., 1983). Anche Roman e coll. (Roman S et al., 2010), hanno osservato che la positività anticorpale verso gli ACA si riscontrava soprattutto nei pazienti che non mostravano una compromissione esofagea alla manometria. Inoltre in questo studio tutti i soggetti che mostravano disturbi motori esofagei avevano una positività anticorpale agli anti-Scl70. Numerosi sono gli studi presenti in letteratura che riportano una certa associazione tra coinvolgimento esofageo e positività agli Scl-70 (Stacher G et al., 2000; Savas N et al., 2007; Cozzi F et al., 2003). In contrasto con tali risultati sembra essere uno studio manometrico effettuato su un gruppo di pazienti tedeschi: tutti i soggetti sclerodermici ACA positivi presentavano anche un quadro manometrico alterato (Gonzalez R et al., 2001). Tuttavia i soggetti di questo studio erano pochi e tra questi soltanto il 19% era ACA positivo.

Il tratto anorettale è la seconda area più studiata dell'apparato digerente dopo l'esofago. Una disfunzione di questa porzione intestinale è stata riscontrata nel 50-70% dei pazienti con SSc e le conseguenze del coinvolgimento di quest'area hanno un impatto diretto e grave nella qualità della vita del paziente. I soggetti sclerodermici con alterazioni a carico del tratto anorettale possono lamentare diversi sintomi clinici, tra cui: diarrea, stipsi, sensazione di aumentata pienezza rettale ed urgenza alla defecazione (Sallam H et al., 2006). La correlazione tra sintomatologia ed alterazioni della motilità anorettale non sembra essere molto stretta. Infatti, nel corso della malattia, i disturbi motori rilevabili con l'esame manometrico anorettale si verificano molto prima della comparsa della sintomatologia. La porzione del tratto anorettale maggiormente colpita sembra essere lo sfintere anale interno (SAI), composto da fibre muscolari lisce, che subisce un processo fibrotico con deposizione di fibre collagene e alla fine diviene atrofico. Il coinvolgimento del SAI può essere evidenziato da un normale esame obiettivo del paziente: infatti con un'esplorazione rettale si può rilevare una diminuzione del tono dello sfintere a riposo (Domsic R et al., 2008). L'incontinenza fecale, infatti, sembra trovare la sua causa principale in una diminuzione della pressione del canale anale (Chiou et al., 1989) e lo sfintere anale interno contribuisce per il 75 % alla pressione basale del canale anale, il restante 25% è da attribuire allo sfintere anale esterno (Ellen C. et al., 2008). Gli studi manometrici hanno permesso di rilevare altri disturbi motori a carico del tratto anorettale in corso di SSc, infatti, oltre ad una diminuzione della pressione basale si ha anche una diminuzione della contrazione massima volontaria. Questa si ottiene richiedendo al paziente, durante l'esame, la contrazione massima dell'ano e riflette l'attività contrattile dello sfintere anale esterno. Tale contrazione, secondo lo studio di Herrick AL (A L Herrick et al., 1996), sembra essere maggiormente ridotta nei soggetti sclerodermici che lamentavano diarrea e incontinenza, rispetto sia ai pazienti che mostravano un quadro di stipsi, che a quelli asintomatici, lasciando intravedere una

possibile correlazione tra l'incontinenza e la compromissione della contrazione massima volontaria. La *compliance* rettale (misurata con i rapporti pressione/volume dati da volumi crescenti di distensione rettale) esprime l'adattamento della parete rettale al riempimento fecale dell'ampolla rettale e sembra essere un parametro da valutare nel paziente sclerodermico. Infatti la deposizione di tessuto collagene a livello della parete muscolare del retto può causare una riduzione della *compliance* rettale, documentata, tra l'altro, in diversi studi (Whitehead WE et al., 1989; Chiou AW et al., 1989; Kim KC et al., 1996). Dobbiamo inoltre ricordare come molti studi manometrici del segmento anorettale hanno evidenziato un'alterazione del riflesso retto- anale inibitorio (RAIR, Rectoanal Inhibitory Reflex) (deSouza N et al., 1998; Jaffin BW et al., 1997). Questo è il riflesso fisiologico, intrinseco, che consiste nell'inibizione dell'abituale attività tonica dello sfintere anale interno, in risposta alla distensione dell'ampolla rettale.

Il plesso mioenterico appare intatto, suggerendo che il coinvolgimento della muscolatura liscia esofagea è primitivo, piuttosto che secondario.

La ridotta mobilità del tenue è dovuta ad una simile, ma molto meno frequente (20% dei pazienti), atrofia della muscolatura liscia che può causare l'insorgenza di sintomi quali senso di gonfiore e dolore addominale con o senza episodi di "pseudo-ostruzione intestinale". In alcuni casi è presente una sindrome da malassorbimento intestinale con diarrea, notevole perdita di peso e anemia secondaria a eccessiva crescita batterica nell'intestino atonico o anche all'ostruzione dei vasi linfatici da parte della fibrosi.

L'interessamento dell'intestino crasso può portare alla formazione di caratteristici diverticoli a base larga a livello del colon trasverso o discendente. L'ipomobilità del colon può condurre a stipsi cronica e formazione di fecalomi con episodi di ostruzione intestinale. In alcuni pazienti è talora presente incontinenza o prolasso rettale a causa della lassità dello sfintere anale.

Le alterazioni della motilità intestinale che si riscontrano in corso di malattia sono spesso gravi, infatti, sebbene il coinvolgimento gastrointestinale sia, diversamente dalla compromissione renale e cardiopolmonare, causa di morte soltanto nell'11% dei casi (Altaman RD et al., 1991), va sicuramente ad aumentare la morbilità. Un grave coinvolgimento è stato correlato con un aumento della mortalità dell'85% entro i 9 anni dalla diagnosi (Steen V et al., 2000).

1.4.5. Alterazioni dell'apparato respiratorio

L'interessamento polmonare è indice di prognosi sfavorevole e si presenta con simile frequenza nella forma diffusa ed in quella limitata. La malattia parenchimale è visibile radiograficamente come una fibrosi bibasilarare lineare o una fibrosi interstiziale nodulare con ridotta capacità di diffusione del CO (DLCO) e riduzione della capacità vitale (CV) -cioè con pattern di malattia restrittiva. Il paziente accusa dispnea per sforzi sempre più modesti e presenta all'auscultazione caratteristici crepitii. La frequenza e la severità della fibrosi interstiziale sono maggiori nei pazienti Scl-70 positivi rispetto a quelli ACA positivi. Il BAL ha rilevato in alcuni pazienti un'intensa risposta infiammatoria (alveolite), con la presenza nel liquido di lavaggio soprattutto di linfociti e macrofagi.

Molti sono i fattori che partecipano alla formazione della pneumopatia interstiziale cronica fibrosante: probabilmente concorrono fattori immunologici, microcircolatori e genetici. Un'ipotesi accreditata associa la fibrosi al danno endoteliale; ne consegue un'alterata permeabilità della barriera epitelio-endoteliale, cosicché i precursori della fibrosi o i mediatori stessi possono passare dal circolo sanguigno nei tessuti adiacenti causando una alveolite, cioè un accumulo di cellule infiammatorie e/o linfociti a livello alveolare. Si ha quindi l'attivazione dei fibroblasti, che proliferano o producono matrice extracellulare in eccesso.

Altri fattori che sembrano influenzare la genesi della interstiziopatia nel paziente sclerodermico sono le ripetute microaspirazioni di liquido gastrico secondarie a problemi esofagei e fattori ambientali. Quindi la fibrosi polmonare appare essere una risposta stereotipata del polmone ad una varietà di insulti (Black CM et al., 1996).

L'evidenziazione clinica di una pleurite è infrequente, mentre l'evidenza a livello autoptico di una pleurite fibrosa cronica è comune. La pneumopatia sclerodermica presenta un'associazione significativa con la silicosi (sindrome di Erasmus) e con il carcinoma polmonare a cellule alveolari.

L'ipertensione arteriosa polmonare isolata dovuta a vasculopatia obliterante a carico delle arteriose, si sviluppa in una piccola percentuale di pazienti, quasi tutti con SSC limitata; clinicamente si manifesta con dispnea rapidamente progressiva; con la DLCO si rileva una marcata riduzione della capacità di diffusione (<50% rispetto alla norma). Si può diagnosticare precocemente con l'ecocardiogramma, ma spesso è diagnosticata soltanto tardivamente, quando compaiono segni e sintomi di cuore polmonare in fase avanzata. La prognosi è severa nonostante l'uso di farmaci vasodilatanti (Stupi A et al, 1986).

1.4.6. Alterazioni dell' apparato cardiovascolare

Il coinvolgimento cardiaco è spesso clinicamente silente, ma è riconosciuto come fattore indicativo di prognosi infausta ed è una delle principali cause di mortalità nei pazienti sclerodermici. Esso può riguardare l'endocardio, il miocardio ed il pericardio separatamente o contemporaneamente. Sono state riportate alterazioni del microcircolo coronarico con risultante ischemia miocardica, miocardite, pericardite, fibrosi miocardica, anomalie del sistema di conduzione, bradiaritmie e tachiaritmie (Meune C. et al., 2010; Kahan A. et al., 2009; Champion HC. 2008). Inoltre il coinvolgimento cardiaco può essere primitivo oppure secondario ad ipertensione arteriosa polmonare (IPA), interstiziopatia polmonare, o patologia renale, tutte

potenziali complicanze della sclerodermia (Kahan A. et al., 2009). I fattori di rischio del coinvolgimento cardiaco includono la presenza del sottotipo cutaneo diffuso, la rapida progressione della sclerosi cutanea e la comparsa di malattia in età avanzata. (Ferri C. et al., 2002; Perera A. et al., 2007; Manno R.L. et al., 2011). L'IPA è un altro fattore prognostico negativo nei pazienti con sclerodermia. Studi recenti (El-Shafie MM et al., 2011; Vogel-Claussen J. Et al., 2011) suggeriscono che non è inusuale per i pazienti con IPA avere un concomitante difetto di perfusione del ventricolo sinistro nonostante la presenza di arterie coronariche epicardiche normali. L'IPA non è molto frequente ma è una delle più severe complicanze della SSc. In una delle più estese serie, la coorte francese ITINERAIR, la sua prevalenza è stata del 7,85% (Condliffe R. et al., 2009).

Di tutte le manifestazioni di coinvolgimento cardiaco, la depressione della contrattilità miocardica è sicuramente una delle manifestazioni più gravi; la presenza di disfunzione diastolica in pazienti con sclerodermia è stata ampiamente dimostrata (de Groote P. et al., 2008; Maione S. et al., 2005) ed è più prevalente se confrontata con i controlli correlati per età e sesso, aggirandosi fra il 17 ed il 30% (Meune C. et al., 2008; de Groote P. et al., 2008). Sono riportati anche casi di miocardite o miopericardite acuta con rapido declino della frazione d'eiezione del ventricolo sinistroll versamento pericardico è riportato intorno al 14 % (Meune C. et al., 2008). Inoltre, vi è un ampio range di complicazioni dovute a patologia pericardica, inclusa la pericardite acuta, il tamponamento cardiaco e la pericardite costrittiva (Champion HC 2008). Il versamento pericardico è frequentemente asintomatico. Reperti autoptici riportano una frequenza addirittura del 78%. La SSc causa alterazioni soprattutto a carico del miocardio dove si ha un quadro istologico tipico di infiltrazione fibrotica (Valentini G et al., 2008). Tale fibrosi è sostenuta sia da un accumulo di collagene nell'interstizio che da una vasculopatia delle piccole arterie coronarie intramiocardiche. La fibrosi miocardica sembrerebbe avvenire, dopo ripetuti episodi di ischemia focale, risultanti da un'abnorme reattività vasale, con o senza patologie strutturali dei vasi associate. Studi

dimostranti l'effetto di agenti vasodilatatori sulle anomalie della perfusione enfatizzano ulteriormente il ruolo potenziale del vasospasmo coronarico.

Le osservazioni alla SPECT di difetti di perfusione miocardica non correlati alla distribuzione delle arterie coronariche e la reversibilità di taluni difetti di perfusione dopo il trattamento con vasodilatatori, suggeriscono la presenza sia di lesioni ischemiche da vasospasmo (Kahan A. et al., 2006) che spot fibrotici. Infatti, alcuni esami istologici hanno rilevato una diffusa fibrosi discontinua, parcellare, con necrosi a bande non correlate con la stenosi delle coronarie extramurali (Bulkley BH. et al., 1976), mentre altri studi hanno rilevato ipertrofia concentrica intinale associata a necrosi fibrinoide delle arterie coronariche intramurali (James TN. et al., 1974).

Tipici reperti patologici includono, infatti, la presenza di placche di fibrosi miocardica disseminate, arterie coronariche epicardiche normali ma ipertrofia arteriolare concentrica, che conduce alla compromissione della riserva coronarica. Vasospasmo ricorrente, ridotta riserva vasodilatatoria, ischemia focale, danno da ischemia-riperfusion e infiammazione, potrebbero tutti contribuire allo sviluppo di fibrosi miocardica e alla varietà di manifestazioni della patologia miocardica.

La fibrosi miocardica colpisce entrambi i ventricoli con una distribuzione a chiazze e sul piano clinico si manifesta con aritmie sopraventricolari e ventricolari, talvolta responsabili di morti improvvise, scompenso cardiaco diastolico e disturbi della conduzione. Nello studio GENOSIS (*Genetics and Environment in Scleroderma Outcome Study*) un'aritmia clinicamente significativa all'ECG è stata associata ad un'incrementata mortalità (Assassi S. et al., 2009) perciò il tempestivo riscontro di bradiaritmie e tachiaritmie è essenziale.

Un coinvolgimento miocardico sintomatico tuttavia non è comune (meno del 10%) ed è presente quasi esclusivamente in pazienti affetti da SSc diffusa. Invece, lievi segni di disfunzione ventricolare sinistra sono presenti in un'alta percentuale di pazienti (106).

Le manifestazioni di malattia miocardica includono un'insufficienza cardiaca congestizia e diversi tipi di aritmie atriali e ventricolari.

L'ecocardiografia doppler insieme con la valutazione clinica è stata proposta come metodo di scelta routinario per stabilire il coinvolgimento cardiaco, essendo in grado di identificare ogni possibile alterazione cardiaca associata a SSc (Ferri C. et al., 2003).

Studi recenti suggeriscono, tuttavia, che l'ecocardiografia convenzionale potrebbe mancare di sensibilità e non consentire una pronta diagnosi in fase preclinica, quando le terapie sono potenzialmente più efficaci. Infatti, si è dimostrato che nuovi metodi come la risonanza magnetica e lo strain rate imaging sono più sensibili rispetto all'ecocardiografia convenzionale (Meune C. et al., 2008; Allanore Y. et al., 2006; Meune C. et al., 2005; D'Andrea A. et al., 2005).

La risonanza magnetica cardiaca (RMC) infatti è in grado di individuare anomalie cardiache nella SSc con elevata sensibilità. In uno studio di 52 pazienti con SSc, il 75% aveva almeno una alterazione riscontrabile alla RMC (Hachulla AL. Et al., 2009). La valutazione della perfusione dopo vasodilatatori con RMC può anche individuare in modo attendibile l'ischemia, mostrando una compromissione circonferenziale della perfusione subendocardica che si pensa sia dovuta alla patologia del microcircolo (Kobayashi H. et al., 2009). Infine, la RMC sta divenendo una tecnica fondamentale per la valutazione della struttura e funzione del ventricolo destro (Bezante GP et al., 2007) e può essere utile per la differenziazione del coinvolgimento primario del ventricolo destro, dal coinvolgimento secondario dovuto all'IPA.

L'enhancement tardivo con gadolinio è divenuto il *gold standard* per individuare e quantificare la fibrosi miocardica. Recenti acquisizioni nella RMC permettono inoltre una misurazione ancora più accurata della fibrosi miocardica, utilizzando una tecnica di mappaggio in T1 (T1 mapping) e calcolando la frazione di volume extracellulare (Ve) (Iles L. et al., 2008; Messroghli DR et al., 2007; Schelbert EB et al., 2011). Sebbene questa tecnica non sia stata introdotta di routine nello studio della SSc sembrerebbe

essere un importante mezzo diagnostico sia per l'individuazione di patologie subcliniche, sia per valutare la risposta a nuove terapie.

Un altro parametro molto interessante per valutare il coinvolgimento cardiaco sono i peptidi natriuretici. Appunto si è dimostrato che un'elevata concentrazione sierica di NT-proBNP rappresenta un marker accurato di elevata pressione arteriosa sistolica polmonare precoce nella SSc.

Oltre al loro ruolo nella valutazione e gestione dell'IPA, i peptidi natriuretici sono i *markers* candidati per stabilire la disfunzione del ventricolo sinistro e destro. In uno studio recente su 69 pazienti con SSc si è confermato che i valori di NT-proBNP correlavano con la pressione arteriosa polmonare ed erano inversamente correlati alla contrattilità del ventricolo sinistro.

1.4.7. Alterazioni dell'apparato urinario

Il coinvolgimento renale si manifesta clinicamente con ipertensione arteriosa.

La forma sintomatica di interessamento renale nella SSc è rappresentata dalla crisi renale sclerodermica, che in passato rappresentava la maggiore causa di morte dei pazienti affetti da SSc diffusa. Rara nei pazienti con forma limitata, coinvolge approssimativamente il 25% degli individui affetti da SSc diffusa e insorge tipicamente in una fase precoce di malattia (a meno di 4 anni dall'insorgenza). Senza preavviso, il paziente sviluppa un'ipertensione arteriosa con iper-reninemia ed insufficienza renale oligurica. All'esame istologico si notano costrizione delle arterie arcuate e interlobulari e delle arteriole ed è presente una severa iperplasia mucoide subintimale e necrosi fibrinoide (Lapenas D et al, 1978). L'ipertensione elevata può provocare accidenti cerebro-vascolari, insufficienza ventricolare sinistra con edema polmonare acuto, retinopatia ipertensiva di grado avanzato. La crisi renale può anche essere complicata da una microangiopatia, con anemia emolitica e piastrinopenia.

1.4.8. Alterazioni del Sistema nervoso

Il sistema nervoso centrale è raramente colpito nella SSc. A tale livello sono rilevabili alterazioni quali emiatrofia ed encefalopatia ischemica diffusa. Alterazioni elettroencefalografiche possono essere presenti talora anche in pazienti asintomatici. Risulta più spesso colpito il sistema nervoso periferico. Il coinvolgimento più frequente a livello dei nervi cranici e dei nervi periferici è rappresentato, rispettivamente, dalla neuropatia sensitiva del nervo trigemino e dalla sindrome del tunnel carpale. Le alterazioni del sistema nervoso autonomo sono rappresentate da aumento dell'attività del sistema nervoso simpatico, diminuzione della attività del sistema nervoso parasimpatico, anomalie della motilità gastrointestinale, neuropatia autonoma pupillare.

Spesso sono presenti disturbi psichici, soprattutto una sindrome depressiva reattiva ad una patologia a decorso cronico. Le cause sono da ricercarsi nel dolore, nella limitazione funzionale, nella minor tolleranza all'esercizio fisico, nella stanchezza e soprattutto nell'alterazione della propria immagine corporea.

1.4.9. Alterazione di altri organi

Nella tiroide sono state rilevate sia infiammazione linfocitica (Tiroidite di Hashimoto) che sostituzione fibrotica della ghiandola: entrambi i quadri sono associati con ipotiroidismo. Cirrosi biliare è stata rilevata in alcune donne affette da sindrome di CREST, ma un coinvolgimento epatico è raro. Anche l'apparato oculare è spesso colpito nella SSc. A parte la sclerosi palpebrale, la lesione principale è la cheratocongiuntivite secca conseguente alla ridotta secrezione lacrimale dovuta alla fibrosi delle ghiandole. La contemporanea xerostomia da ridotta secrezione salivare fa diagnosticare la sindrome di Sjögren secondaria (20 % o più dei pazienti affetti da SSc), dovuta sia ad infiltrazione linfocitica che a fibrosi ghiandolare. La SSc può determinare raramente disturbi a carico del sistema nervoso: neuropatie sensitive dei nervi cranici

(trigemino, faciale, acustico, glosso-faringeo). Quadri clinici acuti di vasculopatia cerebrale sono di solito riconducibili ad una concomitante sindrome da anticorpi antifosfolipidi. Abbastanza frequenti sono i disturbi psichici, in particolare una sindrome depressiva reattiva ad una malattia a decorso cronico, spesso assai invalidante.

Sono stati inoltre individuati alcuni markers sierologici dotati di elevato valore predittivo per la comparsa di specifico interessamento d'organo (Meyer O. ,2006). Un'aumentata produzione di KL-6, una glicoproteina prodotta dalle cellule di tipo II dell'epitelio alveolare, è stata associata ad un maggior rischio di sviluppare interstiziopatia polmonare. Elevati livelli di CD40L, rilasciato dai linfociti T attivati, correlano con la comparsa di ipertensione polmonare e di ulcere ischemiche digitali.

2. DIAGNOSI PRECOCE DI SSC

La diagnosi di SSc è piuttosto semplice nelle fasi di malattia conclamata, in cui l'impegno sclerotico della cute coesiste con il fenomeno di Raynaud e con manifestazioni o reperti laboratoristico-strumentali di impegno degli organi interni (Bellando-Randone S et al, 2010).

Attualmente, come detto precedentemente, la diagnosi viene ancora effettuata in base ai criteri ACR (1980) che richiedono la presenza di sclerosi cutanea prossimalmente alle articolazioni metacarpofalangee o metatarsofalangee, o la presenza di due dei tre criteri secondari (sclerodattilia, ulcere digitali, o fibrosi polmonare) (Masi AT et al., 1980).

Purtroppo questi criteri, che peraltro sono criteri classificativi anche se utilizzati a scopo diagnostico, consentono una diagnosi solo in fasi caratterizzate da fibrosi tissutale, che è solo parzialmente reversibile e può portare a disfunzioni della organi

colpiti; hanno infatti un'alta specificità ma una bassa sensibilità, identificando approssimativamente solo il 70% dei pazienti con SSc. (Lonzetti LS et al., 2001). Un'analisi recente di 9165 pazienti sclerodermici arruolati ha mostrato che l'83,5% soddisfaceva i criteri ACR mentre i restanti pazienti erano pazienti con SSc precoce, lcSSc così come sindromi overlap [Meier FM. et al., 2012).

Negli ultimi anni ci sono stati diversi tentativi di riclassificare la SSc con lo scopo di permettere una diagnosi precoce di questa patologia, così anche da poter includere in studi clinici pazienti che non soddisfacevano i criteri ACR (Valentini G, 2002)

Nel 1996, Fine et al (Fine GL. et al., 1996) proposero di definire pre-sclerodermia condizioni caratterizzate da fenomeno di Raynaud, alterazioni digitali ischemiche, reperti capillaroscopici tipici (megacapillari e/o aree avascolari), anticorpi antinucleari marcatori di malattia (anti-topo I, anti-centromero, anti-RNA polimerasi III).

Nel 2001 LeRoy e Medsger, al fine di superare i limiti dei criteri ACR, hanno proposto i criteri per definire la SSc in fase precoce (ESSc) come una condizione (LeRoy EC, Medseger TA Jr., 2001) caratterizzata dal Fenomeno di Raynaud (RP) obiettivato da un medico in presenza di anticorpi antinucleari marcatori (anticentromero, anti topo isomerasi I, anti-RNA polimerasi I o III antifibrillarina, anti-PM-SCL, anti-fibrillin o anti-RNA, in un titolo di 1:100 o superiore) (Tan EM., 1989) o di tipiche alterazioni capillaroscopiche (megacapillari e/o aree avascolari) (Maricq HR, LeRoy EC., 1973) o, alternativamente, di fenomeno di Raynaud anamnestico, associato ad entrambi i suddetti reperti.

Le proposte di Fine et al. (Fine GL, et al, 1996) e di Le Roy e Medsger (LeRoy EC, Medseger TA Jr., 2001) sono tuttavia incomplete in quanto, la prima parla di pre-sclerodermia limitando di fatto alla cute la sede dove esplorare la presenza di fibrosi; Le Roy e Medsger non elencano le indagini da eseguire per chiarire l'impegno degli organi interni nei pazienti con "early SSc". L'esistenza, infatti, di pazienti SSc sine scleroderma (Giordano M, et al., 1982) (Poormoghim H, et al., 2000) e di pazienti in cui

l'impegno fibrotico degli organi interni precede quello cutaneo impone che tale approccio sia delineato (Valentini G., 2002). I dati riportati dal gruppo EUSTAR indicano che il tempo che intercorre tra la comparsa del FR e il primo segno o sintomo tipico di SSC è in media di 4,8 anni nella forma cutanea limitata e di 1,9 anni in media nella forma cutanea diffusa (Walker UA, et al., 2007). Questo grande divario temporale tra i sintomi e la diagnosi, che si basa come è stato detto, principalmente sulla fibrosi cutanea, potrebbe essere considerata come una "finestra di opportunità" per poter impostare una strategia terapeutica realmente efficace per il controllo della malattia. Nel corso degli anni sono stati compiuti numerosi tentativi per identificare i criteri necessari per la diagnosi precoce di questa patologia. Recentemente è stata proposta la definizione di "SSc precoce" come stato caratterizzato dal fenomeno di Raynaud, edema digitale, autoanticorpi specifici per SSc, alterazioni microvascolari patognomoniche rilevate alla videocapillaroscopia e alterazioni esofagee i criteri riportati nella tabella 2.1 sono stati proposti ma devono essere ancora validati (Matucci-Cerinic M, et al., 2009)

Tabella 2.1 , criteri preliminari per la diagnosi precoce di SSc

Criteri maggiori

- Fenomeno di Raynaud
- anticorpi (antinucleari, anticentromero, antitopoisomerasi I)
- scleroderma pattern alla videocapillaroscopia

Criteri minori

- calcinosi
- edema digitale
- ulcere digitali
- disfunzione dello sfintere esofageo

– telangiectasia
– vetro smerigliato alla TC torace ad alta risoluzione
*Criteri provvisori per la diagnosi precoce della sclerosi sistemica proposti da EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR).
DIAGNOSI: tre criteri maggiori o due maggiori e uno minore

Matucci-Cerinic M et al, Ann Rheum Dis. 2009

Nel 2010, Hudson *et al.* hanno sviluppato criteri diagnostici per la SSc attraverso l'analisi di un ampio gruppo di pazienti Canadesi (n=1048). In aggiunta al FR e al coinvolgimento cutaneo hanno identificato come importanti indizi il riscontro clinico di telangiectasie, e anticorpi specifici della SSc (ACA and anti-TOPO I), che migliorano la sensibilità dal 57% al 97% (Hudson M., et al., 2010). Comunque questo studio è stato condotto su una coorte di pazienti con diagnosi di SSc già stabile (87.8% dei pazienti soddisfaceva i criteri ACR) e con una durata media di malattia relativamente lunga 11 anni (± 9.5). Anche questi criteri quindi non sono sufficienti per porre una diagnosi precoce.

Dati recenti hanno dimostrato inoltre che il coinvolgimento degli organi interni è precoce e subclinico; alterazioni cardiache (inversione del rapporto E/A), esofagee (pressione sfintere esofageo inferiore < 15 mmHg) e polmonari (DLCO < 80% del pred.) sono state riscontrate infatti nelle primissime fasi della malattia (Valentini G, et al., 2011).

Il fatto che il coinvolgimento degli organi possa essere presente fin dalle prime fasi della SSc conferma la necessità di una diagnosi molto precoce che può quindi consentire di aggredire la malattia in una fase ancora reversibile attraverso un trattamento appropriato, al fine di bloccarne l'evoluzione, mantenere la qualità di vita e di evitare

danni d'organo d'organo riducendo pertanto anche quello che rappresenta un importante costo socioeconomico. (Matucci-Cerinic M, et al., 2012)

2.1.Videocapillaroscopia

La videocapillaroscopia periungueale è considerata il metodo più affidabile, non invasivo, facilmente ripetibile, per valutare sia la comparsa sia la progressione della microangiopatia sclerodermica e quindi per distinguere precocemente tra Fenomeno di Raynaud primario e secondario. Nei pazienti affetti da SSc il pattern più tipico alla videocapillaroscopia ungueale è caratterizzato da capillari irregolarmente ingrossati, capillari giganti (con diametro >50 micron sia a livello dell'arteriola che della venula), microemorragie, disorganizzazione dell'architettura capillare e capillari ramificati. I capillari giganti sono patognomici di SSc.

Nel 2000 Cutolo et al. ha classificato le lesioni microvascolari rilevabili alla capillaroscopia in tre pattern morfologici: "Early", "Active" e "Late" (Cutolo M, et al., 2000).

- Il pattern VCP "Early" è caratterizzato dalla presenza di rari capillari ectasici o giganti, alcune emorragie capillari, architettura relativamente ben conservata, senza evidente perdita di capillari.
- Nel pattern VCP "Active" si osservano frequenti capillari giganti e microemorragie, moderata perdita di capillari, modesto sovvertimento dell'architettura vascolare, assenti o saltuari capillari ramificati.
- Il pattern VCP "Late" si contraddistingue per la ridotta presenza di capillari giganti ed emorragie, mentre si può osservare una severa perdita di capillari con estese aree avascolari, sovvertimento architettonico con irregolare dilatazione dei capillari e frequenti ramificazioni da neoangiogenesi (Cutolo M, et al., 2000) (Secchi M.E, et al., 2009) (Figura 2.1).

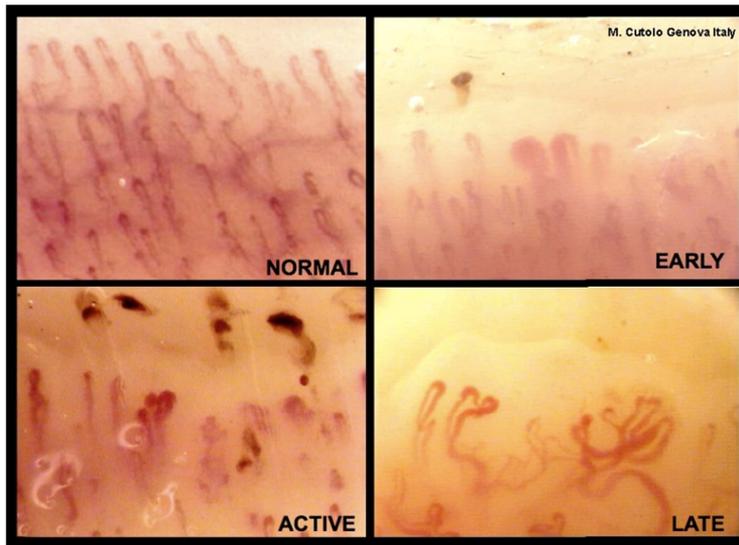


Figura 2.1 The scleroderma pattern: normal, early, active and late nailfold videocapillaroscopy patterns (original magnification 200_, M. Cutolo)

La videocapillaroscopia è ritenuta fondamentale anche nel follow up (consigliato semestrale/annuale) dei pazienti con fenomeno di Raynaud primario in quanto Cutolo et al hanno osservato che il 20% dei pazienti inizialmente diagnosticati come aventi Fenomeno di Raynaud primario sono evoluti, durante un periodo di follow up di circa 3-10 anni, in Fenomeno in Raynaud secondario sospetto o certo sulla base appunto di una associata connettivite riscontrata. L'incidenza annuale di transizione a FR "secondario sospetto" era del 2%, mentre quella a FR "secondario certo" era dell'1% (Cutolo M, et al., 2007). Oggi è accertato che l'esame microscopico del letto periungueale, in presenza di alterazioni che rientrano nello scleroderma pattern (megacapillari, microemorragie e/o aree avascolari), ha un valore predittivo positivo (Maricq HR, et al., 1980) (Cutolo M, et al., 2003), soprattutto per lo sviluppo delle malattie dello "scleroderma spectrum". Tecnicamente, l'esame viene effettuato mediante un apparecchio, il videocapillaroscopio (figura n. 2.2). dotato di monitor collegato ad una sonda ottica (figura n. 2.3) contenente una telecamera. Lo studio

del microcircolo viene effettuato prevalentemente a livello della cute periungueale di tutte le dita delle mani, anche se in genere le condizioni di migliore visibilità dei capillari periungueali si rilevano al quarto e quinto dito della mano non dominante. Il paziente deve essere in posizione seduta o distesa, con il palmo della mano appoggiato sul piano di osservazione del capillaroscopio, mantenendo la massima immobilità.

Sulla cute periungueale si applica una goccia di olio di cedro per eliminare l'aberrazione ottica provocata dalla presenza di aria che si interpone tra la lente e la cute ed ottenere quindi le migliori condizioni di visibilità della rete microvasale. Lo studio del microcircolo deve essere effettuato dopo una fase di acclimatamento di durata variabile, in rapporto alle differenze tra temperatura esterna e temperatura ambiente. Inoltre, il paziente non deve avere fumato di recente né avere effettuata manicure. La durata di un esame è in media di quindici minuti.

Figura 2.2



Figura 2.3



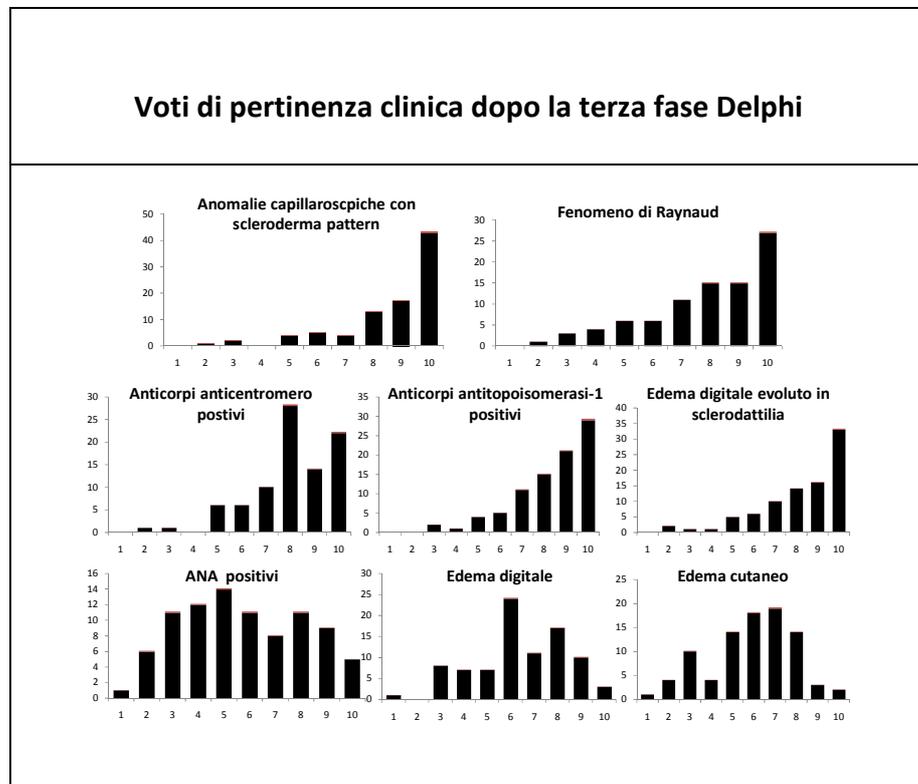
3. EUSTAR E PROGETTO VEDOSS

EUSTAR (European League Against Rheumatism (EULAR) Scleroderma Trials and Research) è un gruppo di ricerca a livello europeo, fondato nel 2002, i cui scopi principali sono quelli di promuovere lo studio e la cura della sclerodermia e di raggiungere un consenso sugli standard evidence-based per la gestione dei pazienti affetti da sclerodermia in tutta Europa.

Negli ultimi anni molti sono stati i tentativi che hanno avuto come scopo quello di permettere una diagnosi precoce di SSc e quindi anche di definire un approccio diagnostico tale da poter permettere di individuare precocemente un impegno preclinico degli organi interni. In una recente indagine di Delphi, promossa da EUSTAR, sono stati individuati 4 segni/sintomi necessari per una diagnosi precoce di SSc: Fenomeno di Raynaud, edema digitale, ANA, anticorpi specifici per la sclerodermia

(anticorpi anticentromero e anticorpi anti-topoisomerasi-I) e videocapillaroscopia (VCP). Gli esperti hanno quindi identificato il FR, la positività degli ANA e l'edema digitale come "bandiere rosse" delle quali almeno due devono essere presenti per eseguire ulteriori accertamenti per definire la diagnosi (anticorpi anticentromero e anticorpi anti-topoisomerasi-I e videocapillaroscopia) (Tabella 3.1). L'ipotesi è che questi 4 criteri siano i più predittivi per porre una diagnosi di sclerosi sistemica in fase molto precoce, ma devono essere verificati mediante uno studio prospettico di coorte. (Avouac J, et al., 2010)

Tabella 3.1



(Avouac J, et al., 2010)

Rispetto ai criteri classificativi proposti da LeRoy e Medsger nel 2001, gli esperti hanno individuato un nuovo elemento, vale a dire la presenza di edema digitale, come un campanello d'allarme ulteriore per sospettare precocemente la presenza di sclerosi sistemica. L'edema digitale è ritenuto infatti un segno precoce di connettivopatia ed è stato trovato essere un predittore indipendente di evoluzione del Fenomeno di Raynaud in SSc (Luggen M et al, 1995). Inoltre, non esiste una definizione chiara per la valutazione dell'edema digitale e di come distinguere una fase edematosa dalla prima fase di sclerodattilia o da altre malattie che presentano edema digitale (ad esempio, malattie della tiroide, malattie dei vasi linfatici ecc.)

Sulla scia dei risultati ottenuti mediante l'indagine Delphi è stato disegnato un progetto europeo affinché si possano identificare definitivamente i criteri necessari per la diagnosi molto precoce di sclerodermia (**VEDOSS**; "Very Early Diagnosis Of Systemic Sclerosis"), promosso dai centri EUSTAR.

L'obiettivo primario di tale studio è quindi quello di sviluppare un test di screening per la diagnosi molto precoce della SSc (VEDOSS) in una popolazione a rischio. In questo protocollo, alcune manifestazioni cliniche e laboratoristiche di SSc precoce vengono studiate in senso prospettico al fine di determinare la loro capacità di discriminare tra pazienti con e senza SSc. Sebbene questo studio sia di natura osservazionale e non intervenga con trattamenti, include valutazioni aggiuntive dell'andamento di malattia come le prove di funzionalità respiratoria, la manometria esofagea e anorettale e altri test al base-line e durante il follow up. Idealmente, utilizzando un test di screening individuale o una combinazione di alcuni test di screening dovrebbe ridurre il numero di visite di follow up non necessarie ed aumentare il numero di veri. VEDOSS è uno studio prospettico osservazionale multi-centrico di una coorte di pazienti con almeno due marcatori compatibili con SSc ma che ancora non ne confermano la diagnosi. L'inclusione dei pazienti dipende dalla presenza del fenomeno di Raynaud (FR) e la popolazione è suddivisa in due gruppi a seconda dello stato degli ANA. Tutti i pazienti

che hanno FR e ANA positivi sono inclusi e seguiti per almeno 5 anni. I pazienti che hanno FR e sono ANA negativi sono seguiti solo in un numero limitato di pazienti o se sono positivi per anticorpi specifici per SSc o se hanno un pattern capillaroscopico specifico. Il periodo di reclutamento dura 2 anni seguito da un follow up di 5 anni (che potrà essere esteso a 15 anni); i primi risultati saranno disponibili dopo un follow up di 3 anni. Tutti i pazienti inclusi sono valutati al basale e successivamente annualmente, usufruendo di un set standardizzato di misure e utilizzando un sistema di raccolta dei dati on line (VEDOSS on line).

PARTE SECONDA

4. INTRODUZIONE ALLA RICERCA

La sclerosi sistemica è una patologia associata a grave disabilità, aumento della mortalità oltre a rappresentare un elevato costo socio-economico per la società. Il corso della SSc è imprevedibile, può infatti rapidamente evolvere in danno d'organo, in particolare nei pazienti con la forma cutanea diffusa (dcSSc), o può avere un decorso più indolente (più spesso nella forma cutanea limitata / lcSSc /).

Le fasi precoci della sclerosi sistemica sono solitamente caratterizzate dalla insorgenza del fenomeno di Raynaud, dall'edema digitale, dalla sclerodattilia e, nella maggior parte dei casi, dalla positività di autoanticorpi specifici per la sclerodermia. Le manifestazioni precoci di malattia di cui sopra, tuttavia, non sono specifiche per la SSc potendo essere presenti in combinazioni variabili anche in altre connettiviti (UCTD, MCTD) o in soggetti che comunque non svilupperanno mai una SSc. Tutto questo pone il reumatologo di fronte al difficile compito di riuscire a riconoscere il prima possibile

quello che si nasconde dietro il fenomeno di Raynaud che, nonostante la scarsa specificità, è stato individuato come il segno pilota per sospettare la presenza di SSc.

Negli ultimi anni sono stati compiuti diversi tentativi allo scopo di definire la fase iniziale della SSc (Matucci-Cerinic M, et al., 2009) e, recentemente, anche il concetto di SSc molto precoce è stato ampiamente accettato e studiato (Avouac J, et al., 2010).

La differenza tra sclerosi sistemica precoce e sclerosi molto precoce è sottile, forse anche difficile da cogliere ma sostanziale per la futura gestione di questa patologia e delle sue complicanze ancora oggi causa di un'alta mortalità.

Una diagnosi molto precoce, può consentire infatti di utilizzare farmaci potenzialmente efficaci che potrebbero bloccare, o almeno rallentare la progressione della malattia. Predittori affidabili del futuro corso della malattia devono ancora essere validati e quindi, tutto il gruppo di pazienti con SSc devono essere seguiti regolarmente, anche se la frequenza ideale di tali visite non è ancora stata stabilita. La mancanza di criteri diagnostici precoci e di predittori validi di evoluzione della malattia significativamente limita fino ad ora l'identificazione e il trattamento del paziente nella prima fase della malattia (Matucci-Cerinic M, et al., 2009). Il Fenomeno di Raynaud e l'edema digitale con successiva sclerodattilia sono state considerate come bandiere rosse (Red Flags) che devono portare a sospettare precocemente la presenza di SSc, e quindi inviare il paziente ad un centro di riferimento da parte del medico di medicina generale affinché possano essere eseguiti ulteriori accertamenti. La diagnosi di sclerosi sistemica molto precoce viene confermata se riscontrata la positività degli anticorpi specifici di malattia e/o alterazioni al pattern capillaroscopico (Avouac J, et al., 2010). Il recente riscontro inoltre, di almeno un'alterazione preclinico funzionale presente nel 48,7% dei pazienti in fase precoce SSc (definita come fenomeno di Raynaud con autoanticorpi marcatori di SSc e / o tipici reperti capillaroscopico e con manifestazioni come puffy dita o artrite) (Valentini G, et al., 2012) impone una sempre maggiore attenzione all'esecuzione di esami strumentali volti ad individuare il coinvolgimento d'organo

anche nelle fasi precoci e asintomatiche. Infatti non essendo ancora disponibili terapie di fondo efficaci per la SSc, come invece presenti per altre malattie reumatiche (es artrite reumatoide), l'obiettivo principale è quello di prevenire o quanto meno identificare precocemente il coinvolgimento d'organo.

L'esofago è sicuramente un importante bersaglio in corso di SSc, risultando la porzione del tratto gastrointestinale più colpita (Roman S. et al., 2010), il coinvolgimento esofageo si riscontra infatti in un'alta percentuale di pazienti che, secondo le diverse casistiche, varia dal 50 al 90%. Tuttavia spesso è asintomatico e pertanto le manifestazioni cliniche non ci permettono di fare una diagnosi precoce delle complicanze della malattia a livello gastrointestinale.

Una disfunzione del tratto anorettale è stata riscontrata nel 50-70% dei pazienti con SSc e le conseguenze del coinvolgimento di quest'area hanno un impatto diretto e grave nella qualità della vita del paziente.

Il coinvolgimento cardiaco nella SSc infatti è stato documentato fin dagli anni '60 con studi autoptici che hanno evidenziato nel 70%-80% dei casi la presenza di fibrosi miocardica, caratterizzata da necrosi a bande di contrazione di entrambi i ventricoli e fibrosi sostitutiva in assenza di concomitante malattia coronarica. Poiché il coinvolgimento cardiaco è rilevabile clinicamente solo nel 20%-25% dei pazienti, queste alterazioni sono frequentemente sottostimate e sottodiagnosticate. L'interessamento cardiaco clinicamente evidente è un fattore prognostico fortemente negativo, tanto che, la mortalità a 5 anni diventa del 30%. Queste evidenze mettono in luce l'importanza di una diagnosi precoce per attuare una terapia mirata.

L'ecocardiografia è la metodica utilizzata di routine per lo studio dell'interessamento cardiaco, ma non è una procedura adeguata per valutare la presenza di fibrosi miocardica. La RMC con DE del gadolinio è il gold-standard per la valutazione della fibrosi miocardica e le sequenze T2-pesate per la valutazione dell'edema miocardico.

5. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo studio è quello di sviluppare un protocollo di screening per diagnosticare la presenza di SSc in fase molto precoce in pazienti a rischio (pazienti con fenomeno di Raynaud) valutando la frequenza di ogni elemento diagnostico proposto durante l'esercizio Delphi in questa coorte di pazienti ed esaminando il numero di pazienti che rispondono ai criteri proposti per la diagnosi molto precoce di sclerosi sistemica al momento dell'arruolamento nello studio. Il centro di Firenze ha voluto poi indagare in maniera più approfondita il coinvolgimento gastrointestinale e cardiaco: il primo in quanto già noto dalla letteratura essere il primo apparato ad essere interessato sebbene non sia conosciuta né la frequenza del coinvolgimento né quanto precocemente questo sia coinvolto; il secondo in quanto il coinvolgimento cardiaco è fattore prognostico negativo nella SSc ma non siamo a conoscenza di quanto precoce sia questo coinvolgimento. Per completezza d'indagine, nel coinvolgimento cardiaco abbiamo inserito anche un gruppo di controllo positivo composto da pazienti con SSc conclamata.

5.1 Obiettivi primari

- Determinare la capacità discriminatoria e predittiva delle caratteristiche cliniche ed esami di laboratorio (in particolare la presenza di anticorpi specifici per la SSc e il pattern capillaroscopico) da soli e in combinazione per porre diagnosi di SSc nei pazienti con fenomeno di Raynaud.
- Valutare le anomalie della motilità esofagea ed anorettale al fine di evidenziare quale di questi tratti enterici sia interessato precocemente dalla malattia.
- Valutare le possibili correlazioni tra il coinvolgimento esofageo ed anorettale, rilevato mediante l'esame manometrico, e le caratteristiche

cliniche del paziente: fenomeno di Raynaud, pattern alla capillaroscopia, positività anticorpale (ANA, ACA, anti-topoisomerasi I), edema digitale.

- Indagare il valore aggiunto della RMC con *delayed enhancement* (DE) per identificare la presenza di fibrosi miocardica ed edema tissutale nei pazienti con diagnosi Very Early SSc, SSc in fase precoce di malattia (Early SSc) e SSc, valutando le possibili correlazioni con i parametri clinici, laboratoristici e strumentali

6. MATERIALI E METODI

Questa risulta essere un'analisi ad interim all'interno del progetto VEDOSS in quanto è prevista l'analisi dei dati di 3 anni di follow up, estensibile a 15 anni, dei pazienti arruolati finora.

6.1. Pazienti

Lo studio in oggetto ha arruolato 567 pazienti con Fenomeno di Raynaud afferenti alla Divisione di Reumatologia del Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Firenze e ad altri 33 centri europei, specializzati nella sclerosi sistemica, del gruppo EUSTAR. I pazienti arruolati da 5 centri rappresentano circa il 70 % del totale (Firenze 43.2%, Zurigo 10.7%, Brescia 5.3%, Praga e Catania entrambi 4.4%). Tutti i centri europei partecipanti avevano precedentemente ottenuto l'approvazione del comitato etico locale. I pazienti sono stati arruolati previa firma del consenso informato.

Tale popolazione in studio è stata seguita per un periodo di due anni durante i quali i pazienti sono stati studiati per le caratteristiche cliniche e laboratoristiche e soprattutto sono stati eseguiti esami strumentali volti a comprendere l'eventuale interessamento precoce degli organi interni.

Dei 246 pazienti arruolati il centro di Firenze ha poi analizzato un numero complessivo di 59 pazienti per quanto riguarda le della motilità esofagea ed anorettale tramite l'esecuzione di manometria esofagea ed anorettale in collaborazione con l'*Ambulatorio per la Diagnosi strumentale dei Disordini motori dell'Apparato Digerente* del prof. Pucciani. Sono stati inoltre valutati 165 pazienti, che soddisfacevano i criteri per la diagnosi di SSc, Early SSc o Very Early SSc per quanto riguarda il coinvolgimento cardiaco precoce in collaborazione con l'Unità Operativa di Reumatologia dell'Università degli Studi di Pisa e il CNR di Pisa.

CRITERI DI INCLUSIONE E DI ESCLUSIONE

Criteri di inclusione:

- Pazienti con fenomeno di Raynaud
- Età > 18 anni

Criteri di esclusione:

- Pazienti con pregressa diagnosi di SSc secondo la classificazione dalla American College of Rheumatology (ACR) inclusi tutti i pazienti con qualsiasi altra malattie del tessuto connettivo (CTD) che, in parallelo, soddisfano i criteri ACR per la SSC (overlap)
- Pazienti non disponibili per il follow-up annuale per il periodo previsto dallo studio della durata di 3 anni (motivi psicologici, logistici, discrezione dello sperimentatore)
- Interventi chirurgici a livello esofageo od anorettale (per i pazienti sottoposti a manometria esofagea e anorettale)
- Malattie neurologiche anorettale (per i pazienti sottoposti a manometria esofagea e anorettale)
- Coronaropatia nota (per i pazienti sottoposti a RM cardiaca).

- Valvulopatia significativa (almeno moderata) (per i pazienti sottoposti a RM cardiaca)
- Storia di fibrillazione atriale (per i pazienti sottoposti a RM cardiaca)
- Gravidanza (per i pazienti sottoposti a RM cardiaca)

I pazienti con fenomeno di Raynaud sono stati visitati una prima volta al baseline, poi una volta l'anno o più frequentemente in base alle esigenze del singolo presso il nostro ambulatorio VEDOSS. Anche nelle forme molto precoci di sclerosi sistemica, infatti, il decorso è assolutamente imprevedibile, pertanto anche la cadenza delle visite ambulatoriali così come la strategia terapeutica deve essere assolutamente personalizzata.

Di ogni paziente sono state analizzate le caratteristiche cliniche, prendendo in esame la presenza di edema digitale, ulcere digitali, digital pitting scars, teleangectasie, calcinosi, sfregamenti tendinei, i sintomi corrispondenti alla sindrome di compressione del nervo mediano, i sintomi esofagei. Il coinvolgimento cutaneo è stato stabilito mediante il Rodnan skin score modificato [16]. Sclerodattilia è stato codificato quando ispessimento della pelle è stato trovato solo sulle dita e non prossimali alle articolazioni metacarpo (così lo spessore della pelle è stato bilaterale ≥ 1 in base alla scala 0-3 del MRSS senza coinvolgimento volto)

Di ogni paziente sono stati raccolti i dati anamnestici con particolare attenzione ai fattori di rischio cardiovascolare (Diabete Mellito, storia presente o passata di esposizione tabagica, ipertensione arteriosa e dislipidemia) e analizzate le caratteristiche cliniche, prendendo in esame la presenza di:

- fenomeno di Raynaud e relativa durata
- edema digitale
- teleangectasie
- ulcere cutanee

- calcificazioni sottocutanee
- sclerodattilia (ispessimento della pelle solo sulle dita e non prossimale alle articolazioni metacarpo (ispessimento cutaneo bilaterale ≥ 1 in base alla scala 0-3 del MRSS senza coinvolgimento volto)
- coinvolgimento cutaneo stabilito mediante il Rodnan skin score modificato (Clements PJ, 1995)
- sintomi clinici esofagei (pirosi, rigurgito, reflusso gastroesofageo, disfagia) ed anorettali (diarrea, stipsi ed *urges incontinence*)

A tutti i pazienti è stata quindi eseguita una videocapillaroscopia periungueale per la valutazione del microcircolo con la classificazione nei patterns early, active e late secondo Cutolo et al. (J Rheumatol 2000) ed è stata effettuata la ricerca del profilo autoanticorpale (ANA, anti-centromero, anti-Scl-70, ENA, anti-dsDNA, ANCA, anti-cardiolipina, anti-beta2GP1, anti-fosfolipidi, LAC) al baseline e ogni 12 mesi.

In caso di positività autoanticorpale (ANA o anticorpi SSc specifici) o alterazioni del pattern videocapillaroscopico è stato valutato il potenziale coinvolgimento d'organo mediante:

- Ecocolordoppler cardiaco con misurazione delle pressioni polmonari, ECG, per la valutazione dell'impegno cardiaco ogni 12 mesi
- Prove di funzionalità respiratoria con misurazione del DLCO e Tc torace ad alta risoluzione per la valutazione dell'impegno polmonare ogni 12 mesi
- I pazienti sottoposti all'approfondimento del coinvolgimento cardiaco da parte del centro di Firenze: Studio funzionale di risonanza magnetica a riposo con contrasto (DE-RM) per valutare la presenza di fibrosi miocardica e sequenze T2-pesate per la ricerca della presenza di edema cardiaco. Le immagini tardive di DE sono state acquisite circa 10 minuti dopo somministrazione di contrasto

endovenoso (Gadolinio). Entro una settimana prima della RMC, i pazienti erano sottoposti a prelievo per NT-proBNP.

- I pazienti sottoposti all'approfondimento del coinvolgimento esofageo/anorettale da parte del centro di Firenze: Manometria esofagea e anorettale

La popolazione di pazienti arruolati nel progetto VEDOSS è stata quindi suddivisa in due grossi gruppi, ovvero pazienti con fenomeno di Raynaud/ANA+ e pazienti con fenomeno di Raynaud/ ANA-. In caso di assenza di ulcere digitali, edema digitale, digital pitting scars, sclerodattilia o alterazioni del pattern capillaroscopico di controllo è stata posta diagnosi di fenomeno di Raynaud primitivo.

Tutti i dati relativi ai pazienti sono stati inseriti in una CRF apposita da tutti i centri partecipanti una volta l'anno nel VEDOSS database on line, un sistema elettronico per la raccolta centralizzata dei dati consultabile esclusivamente dai medici aderenti al progetto.

6.2 Manometria esofagea ed anorettale

MANOMETRIA ESOFAGEA

I pazienti prima di sottoporsi alla manometria esofagea hanno effettuato la seguente preparazione:

- digiuno dalla sera precedente;
- sospensione dei farmaci calcio-antagonisti, nitroderivati e β -bloccanti da una settimana;
- Rx esofageo e/o esofago-gastro-duodenoscopia;
- esami ematici: HbsAg ed HCV.

La manometria esofagea consiste nella registrazione delle variazioni pressorie all'interno dell'esofago. Questo è possibile grazie all'introduzione di un catetere multicanale, con "side-holes"(5 cm l'uno dall'altro) all'interno dei quali è spinta a pressione nota una colonna di liquido. Le estremità prossimali dei sondini sono collegate, attraverso dei trasduttori di pressione, ad un computer che elabora una grafica (figura 6.1).

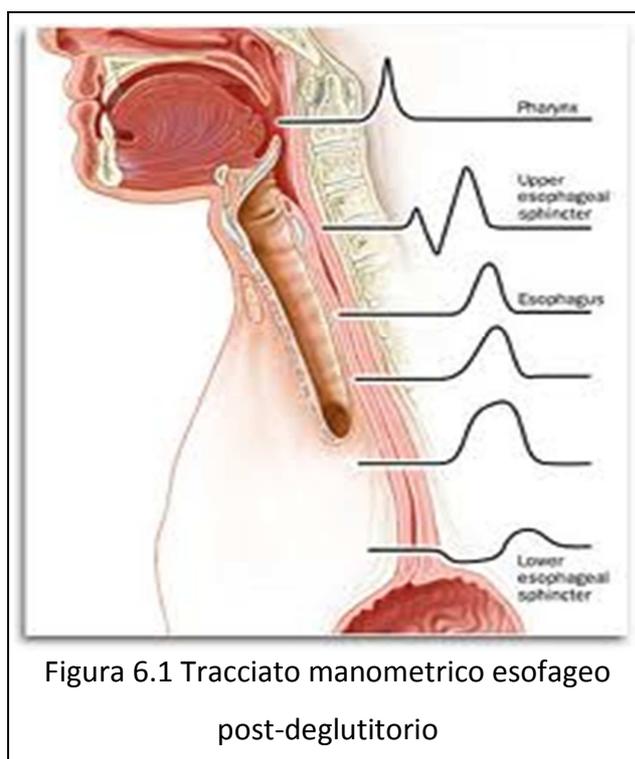


Figura 6.1 Tracciato manometrico esofageo post-deglutitorio

Dello sfintere esofageo inferiore (SEI) si valuta la pressione, massima e media e la sua lunghezza. Inoltre è possibile rilevare il rilasciamento post-deglutitorio dello sfintere valutando l'inizio, la durata e la percentuale del rilasciamento. Uguali sono le caratteristiche manometriche prese in considerazione per lo sfintere esofageo superiore (SES).

Per quanto riguarda il corpo esofageo viene misurata la peristalsi primaria-post-deglutitoria (tabella 6.1).

Le registrazioni e le analisi dei tracciati sono stati fatti da un sistema computerizzato (Dyno Compact, Menfis bioMedica® s.r.l., Bologna, Italia).

Tabella 6.1

Manometria esofagea	
<u>Sfintere esofageo inferiore:</u>	
a) HPZ	
	<ul style="list-style-type: none">▪ P max (mmHg)▪ P med (mmHg)▪ Lungh (cm)▪ Area (mmHg*cm)
b) RLASCIAMENTO POST-DEGLUTITORIO	
	<ul style="list-style-type: none">▪ % Rilasciamento (%)▪ Durata (s)▪ Inizio (s)
<u>Esofago:</u>	
a) PERISTALSI PRIMARIA	
	<ul style="list-style-type: none">▪ V prop (s)▪ P max (mmHg)▪ P med (mmHg)▪ Durata (s)
b) PRESSIONE ENDOESOFAGEA	
c) ALTRA ATTIVITÀ	
<u>Sfintere esofageo superiore:</u>	
a) HPZ	

- P max (mmHg)
- P med (mmHg)
- Lungh (cm)
- Area (mmHg*cm)

b) RILASCIAMENTO POST-DEGLUTITORIO

- %Rilasciamento (%)
- Durata (S)

MANOMETRIA ANORETTALE

Tutti i pazienti che soddisfacevano i criteri di inclusione sono stati sottoposti a manometria anorettale usando la tecnica standard (Pucciani F et al., 1996).

Prima di sottoporsi alla manometria anorettale i pazienti hanno effettuato la seguente preparazione:

- colonscopia
- un clistere la sera precedente il giorno dell'esame ed un altro la mattina del giorno stesso dell'esame;
- esami ematici: HbsAg ed HCV.

Per l'esame è stato utilizzato un catetere manometrico, di piccolo diametro (3-6mm) collegato ad un palloncino (figura 6.2).

Le registrazioni e le analisi dei tracciati sono stati fatti da un sistema computerizzato (Dyno Compact, Menfis bioMedica® s.r.l., Bologna, Italia).

La pressione anale a riposo è stata misurata quattro volte ed è stata registrata in mmHg. Le analisi computerizzate hanno identificato la pressione massima (Pmax) e la pressione media (Pmed) del canale anale.

La contrazione volontaria massima (MVC) è stata valutata chiedendo al soggetto di contrarre volontariamente lo sfintere anale per quanto più a lungo poteva.

Il riflesso rettoanale inibitorio (RAIR, "Rectoanal Inhibitory Reflex") è stato evocato gonfiando il palloncino elastico di gomma nel retto, posizionato a 10 cm dal margine anale: il volume veniva aumentato 20 ml alla volta secondo Martelli et al. (Martelli H et al., 1978).

In ogni paziente è stato determinato il primo volume di distensione a cui si verificava il rilasciamento dello sfintere anale interno (RAIRT, "RAIR Threshold") ed il volume di distensione per cui si verificava un'iniziale transitoria sensazione defecatoria (CRST; "Conscious Rectal Sensitivity Threshold").

In tutti i soggetti è stato misurato anche il volume massimo tollerato (MTV): questo volume viene considerato un'espressione della capacità rettale di serbatoio.

La *compliance* del retto (espressione del rapporto mmHg/ml dell'aria insufflata) è stata rilevata attraverso le media della curva pressione/volume.

L'esame manometrico è terminato con la misurazione delle pressioni anali durante un tentativo di defecazione (straining test). Lo straining test viene considerato positivo se si verifica un improprio aumento o diminuzione del 20% del rilasciamento della pressione basale (tabella 6.2).

Tabella 6.2

Manometria anorettale	
<u>Pressione del canale anale:</u>	
a) Pressione basale (ARP)	
▪	4 cm
▪	3 cm
▪	2 cm
▪	1 cm
▪	Lungh (cm)
▪	P max (mmHg)
▪	P med (mmHg)

b) Contrazione volontaria massima (MVC)

- P max (mmHg)
- P med (mmHg)
- Durata (s)
- Dur. 50% (s)
- Area (mmHg*s)

b) Straining test

Riflesso rettoanale inibitorio (RAIR):

- MAR (%)
- RT (s)
- CT (s)
- TDR (s)

Volume soglia del RAIRT (RAIRT) (ml)

Sensazione rettale:

- a) Volume soglia di percezione cosciente (CRST) (ml)
- b) Volume di percezione costante (CS) (ml)
- c) Volume massimo tollerato (MTV) (ml)

Compliance

Il range di normalità dei valori registrati con l'esame manometrico si sono ottenuti da un campione normale di riferimento di soggetti sani, asintomatici per disturbi gastrointestinali afferenti all' *Ambulatorio per la Diagnosi strumentale dei Disordini motori dell'Apparato Digerente* del prof. Pucciani (Cortesini C., et al., 2002; Pucciani F., et al., 1996).



6.3. RISONANZA MAGNETICA CARDIACA CON MEZZO DI CONTRASTO

I pazienti sono stati studiati con tomografo a RM operante a 1,5 Tesla (CVi, GE Healthcare, Milwaukee, USA). Gli studi sono stati eseguiti utilizzando software cardiaco dedicato, bobine multicanale (*phased array*) e attivazione *vectocardiogram*. La funzione biventricolare è stata valutata utilizzando sequenze SSFP (*steady state free precession*) eseguite in apnea in asse corto cardiaco, orizzontale e verticale. I parametri di sequenza erano i seguenti: *field of view*: 350-400 mm, *repetition time/echo time*: 3,2\1,6ms, *flip angle*: 60°, *matrix*: 224x192, numero di fasi: 30.

Dopo la somministrazione di una dose di mezzo di contrasto di 0,2 mmol/kg di gadolinio-DTPA, l'immagine di *delayed enhancement* (DE) è stata utilizzata per identificare e quantificare il grado di estensione di fibrosi miocardica usando una sequenza *gradient-echo, inversion recovery* T1-pesata.

In asse corto cardiaco, il ventricolo sinistro è stato acquisito con slice contigue di 8mm di spessore. Le immagini sono state acquisite anche in verticale e orizzontale in asse lungo. Le immagini di DE sono state acquisite dopo 8-20 minuti dalla somministrazione del mezzo di contrasto endovena.

Sono state utilizzate immagini *black-blood* T2-pesate STIR *fast spin echo* con soppressione del segnale del tessuto adiposo per la ricerca delle alterazioni di segnale a carico del miocardio, suggestive di edema tissutale.

I parametri di sequenza erano i seguenti: *field of view*: 380 mm, spessore *slice*: 8 mm, *repetition time/echo time*: 4.6/1.3 ms, *flip angle*: 20°, *matrix*: 256×192.

Analisi delle immagini

Tutti gli studi di RMC sono stati analizzati *off-line*, utilizzando una stazione di lavoro (Advantage Workstation, GE Healthcare, Milwaukee, USA) con *software* dedicato (MASS 6.1, Medis, Leiden, Netherlands), da due operatori esperti che non erano a conoscenza della storia clinica dei pazienti. Il volume ventricolare destro e sinistro e la frazione di eiezione sono stati determinati utilizzando immagini cine in asse corto, così come per la determinazione della massa ventricolare sinistra. Volume e massa ventricolare sinistra sono stati indicizzati alla superficie corporea. La presenza di DE è stata determinata con immagini dopo somministrazione di mezzo di contrasto endovena, e, se presente, è stata individuata con immagini su asse corto adottando una soglia di intensità di segnale 6 deviazioni standard (DS) sopra l'intensità di segnale medio di un miocardio normale, come riportato in precedenti studi di RMC nella cardiomiopatia ischemica.

6.4 ECOCARDIOGRAFIA

I pazienti sono stati sottoposti a ecocardiogramma transtoracico completo, utilizzando ecocardiografo in commercio (Sonos 7500 e IE33, Philips Medical Systems, Andover, MA, Stati Uniti d'America; Sequoia C256 Acuson, Siemens Mountain View, California, Famiglia Mylab25, Esaote, Genova, Italia; sistema Vivid 7, GE / Vingmed, Milwaukee, Wisconsin) dotato di trasduttori 2,5-3,5 MHz *phased array*, con seconda armonica e Doppler tissutale (TDI).

Tutti i parametri in M-mode sono stati misurati in proiezione parasternale sinistra secondo i criteri indicati dall'*American Society of Echocardiography* (ASE). Se l'esame M-mode non era possibile a causa dell'allineamento non ottimale, le misurazioni erano effettuate sulle immagini 2-D.

Con tecnica bidimensionale è stata determinata la frazione di eiezione del ventricolo sinistro (metodo di Simpson modificato, sulla proiezione apicale quattro e due camere).

L'escursione sistolica del piano tricuspidalico (TAPSE) è stata registrata dalla proiezione apicale su tracciato M-mode.

Da un approccio sottocostale è stato valutato il diametro della vena cava inferiore e l'escursione respiratoria in modo da stimare la pressione atriale destra (RAP).

La pressione arteriosa polmonare sistolica (PAPs) è stata derivata dalla velocità massima di rigurgito tricuspidalico (TRV) secondo l'equazione di Bernoulli, e aggiungendo il valore della RAP. Le resistenze vascolari polmonari (PRV) sono state stimate con la seguente formula: velocità massima di rigurgito tricuspidalico / integrale velocità-tempo del tratto di efflusso del ventricolo destro x 10 + 0,16.

Con la tecnica TDI (*tissue doppler imaging*), nella modalità Doppler pulsato, si è analizzata la velocità di contrazione (onda S) e di rilasciamento (onda E e onda A) del miocardio. Il TDI del ventricolo destro è stato ottenuto, a partire dalla sezione 4 camere apicale, posizionando il volume campione a livello della porzione laterale dell'anulus tricuspidalico. Il TDI del ventricolo sinistro è stato ottenuto posizionando il volume campione a livello dell'anulus mitralico.

Tutte le misurazioni sono state eseguite secondo le raccomandazioni dell'Associazione Europea di Ecocardiografia (EAE) / Società Americana di Ecocardiografia (ASE)

6.5. ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata usando *Statistical Package for Social Sciences* (IBM SPSS) software per Macintosh, versione 21.0 (IBM Corporation, New York, USA). I dati sono mostrati come media \pm SD. Le analisi sono state divise per variabili continue e discrete. Per le prime è stato usato il test T di Student o il test U di Mann-Whitney per campioni indipendenti; per le altre è stato utilizzato il test del chi quadrato o il test esatto di Fisher.

Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato come statisticamente significativo.

7. RISULTATI

7.1. PROGETTO VEDOSS: dati europei

7.1.1. Pazienti

Sono stati reclutati, a livello europeo, 567 pazienti con fenomeno di Raynaud, di questi tuttavia 51 pazienti (44 ANA+ e 7 ANA-) soddisfacevano i criteri ACR per la SSc e 47 non presentavano dati relativamente agli ANA e quindi sono stati esclusi da ulteriori accertamenti. Dei restanti 469 pazienti il 67,8% (318/469) erano ANA+ (293 donne e 25 uomini) e il 32,2% (151/469) erano ANA negativi. I dati clinici e demografici dei pazienti arruolati sono riportati nella tabella 7.1.1.

Più della metà dei pazienti ANA- sono stati classificati come fenomeno di Raynaud di tipo primitivo in quanto non presentavano alterazioni capillaroscopiche né positività degli anticorpi specifici per la SSc o per altri anticorpi, né presentavano alterazioni ecocolordoppler arti superiori o cardiaco, né alterazioni a livello polmonare, né a livello

ematologico. Anche un primo screening neoplastico ha dato risultati negativi. Sono stati quindi escluse altre situazioni morbose che possono comunque dare FR.

Tabella 7.1.1

Caratteristiche cliniche e di laboratorio	ANA+ pz (n=318)	ANA- pz (n=151)	p value (confronto ANA+ e ANA- pz)	Pz con FR primitivo (n=80)	p value (confronto tra pz ANA+ FR primitivo)	Pz senza ANA (n=47)
Generale						
Femmine, n (%)	293 (92.1%)	130 (86.1%)	0.040	69 (86.3%)	0.101	43 (91.5%)
Età di esordio di FR (aa), media (SD)	40.4 (16.0)	36.5 (18.3)	0.023	32.3 (16.5)	<0.001	31.2 (15.8)
Durata del FR (mesi), mediana (IQR)	55 (23.2; 124)	62 (25; 175.2)	0.214	60.5 (24;185)	0.352	44 (24; 131)
Durata del FR (aa), mediana (IQR)	4 (1.2; 10)	5 (2; 14)	0.142	5 (2; 15)	0.250	3 (2; 10)
Esame obiettivo						
Ulcere digitali in anamnesi /N°. (%)/	19/316 (6.0%)	13/150 (8.7%)	0.290	0/80	0.018	4/40 (10%)
Ulcere digitali al baseline /N°. (%)/	7/316 (2.2%)	10/148 (6.8%)	0.015	0/79	0.353	3/40 (7.5%)
Digital pitting scars in anamnesi /N°. (%)/	18/316 (5.7%)	5/150 (3.3%)	0.362	0/80	0.031	1/40 (2.5%)
Digital pitting scars al baseline /N°. (%)/	15/316 (4.7%)	1/149 (0.7%)	0.027	0/80	0.049	1/40 (2.5%)
Edema digitale in anamnesi /N°. (%)/	122/317 (38.5%)	35/150 (23.3%)	0.001	0/80	<0.001	7/40 (17.5%)
Edema digitale al baseline /N°. (%)/	31/316 (9.8%)	5/149 (3.4%)	0.015	0/84	0.001	1/40 (2.5%)
Coinv. cutaneo (sclerodactilia) /N°. (%)/	32/304 (10.5%)	7/142 (4.9%)	0.051	0/77	<0.001	1/32 (3.1%)
Telangiectasie /N°. (%)/	39/316 (12.3%)	2/148 (1.4%)	<0.001	1/79 (1.3%)	0.001	3/40 (7.5%)
Artralgie in anamnesi/N°. (%)/	49/316 (15.5%)	24/150 (16.0%)	0.891	9/80 (11.3%)	0.336	10/40 (25%)
Artralgie al baseline /N°. (%)/	21/315 (6.7%)	6/149 (4.0%)	0.257	0/80 (0%)	0.011	1/40 (2.5%)

Sintomi esofagei /N°. (%)/	111/315 (35.2%)	27/147 (18.4%)	<0.001	16/77 (20.8%)	0.015	10/40 (25%)
Sd Tunnel carpale /N°. (%)/	22/315 (7.0%)	17/149 (11.4%)	0.109	6/79 (7.6%)	0.850	4/40 (10%)
Tendon friction rubs /N°. (%)/	4/315 (1.3%)	1/149 (0.7%)	1.000	0/80 (0%)	0.587	0/39 (0%)
Calcinosi /N°. (%)/	8/316 (2.5%)	8/149 (5.4%)	0.117	4/80 (5.0%)	0.272	1/40 (2.5%)
Laboratorio						
Autoanticorpi						
ACA /N°. (%)/	135/310 (43.5%)	0/138	<0.001	0/71 (0%)	<0.001	n.a.
anti-TOPO I /N°. (%)/	35/310 (11.3%)	0/137	<0.001	0/69 (0%)	0.001	n.a.
Anti-U1-RNP	17/237 (7.2%)	0/96	0.004	0/52 (0%)	0.049	n.a.
Anti- RNA polymerase III	2/116 (1.7%)	0/22	1.000	0/14 (0%)	1.000	n.a.
anti-fibrillarini	0/61 (0%)	0/16	-	0/11 (0%)	-	n.a.
Anti-PM-Scl	6/182 (3.3%)	0/88	0.182	0/51 (0%)	0.344	n.a.
anti-synthetasi	0/86 (0%)	0/20	-	0/12 (0%)	-	n.a.
Anti-Th/To	1/38 (2.6%)	0/14	1.000	0/9 (0%)	1.000	n.a.
Altri parametri di laboratorio						
VES>25 /N°. (%)/	42/284 (14.8%)	22/124 (17.7%)	0.451	0/61 (0%)	<0.001	n.a.
PCR elevata /N°. (%)/	16/290 (5.5%)	8/124 (6.5%)	0.709	4/63 (6.3%)	0.766	n.a.
CK elevato /N°. (%)/	15/258 (5.8%)	8/91 (8.8%)	0.325	1/38 (2.6%)	0.703	n.a.
Proteinuria /N°. (%)/	5/276 (1.8%)	3/112 (2.7%)	0.695	1/52 (1.9%)	1.000	n.a.
Pattern capillaroscopico						
scleroderma pattern /No. (%)/	164/306 (53.6%)	19/142 (13.4%)	<0.001	0/80 (0%)	<0.001	14/37 (37.8%)
Pattern Early /No. (%)/	47/306 (15.4%)	8/142 (5.6%)		0/80 (0%)		7/37 (18.9%)
Pattern Active /No. (%)/	94/306 (30.7%)	11/142 (7.7%)		0/80 (0%)		7/37 (18.9%)
Pattern Late /No. (%)/	23/306 (7.5%)	0/142 (0%)		0/80 (0%)		0/37 (0%)

No alterazioni specifiche /No. (%)/	142/306 (46.4%)	123/142 (86.6%)		80/80 (100%)		23/37 (62.2%)
Coinvolgimento d'organo						
Fibrosi interstiziale polm all' HRCT /N°. (%)/	18/143 (12.6%)	1/15 (6.7%)	1.000	1/3 (33.3%)	0.344	0/3 (0%)
Vetro smerigliato /N°. (%)/	8/143 (5.6%)	3/15 (20.0%)	0.072	1/3 (33.3%)	0.175	0/3 (0%)
FVC % /media(SD)/	105.6% (15.9%)	106.1% (19.5%)	0.955	-		n.a.
FVC<80%	10/216 (4.6%)	3/26 (11.5%)	0.140	1/4 (25%)	0.187	0/4 (0%)
DLCO /media (SD)/	85.4% (16.5%)	82.7% (14.3)	0.348	-		n.a.
DLCO<80%	70/200 (35.0%)	9/23 (39.1%)	0.695	2/4 (50%)	0.615	1/3 (33.3%)
DLCO/VA /media (SD)/	88.1% (17.3%)	84.1% (17.0%)	0.162	-		n.a.
PAH /N°. (%)/	5/239 (2.1%)	2/33 (6.1%)	0.203	0/11 (0%)	1.000	1/4 (25%)
Disfunzione diastolica /N°. (%)/	34/239 (14.2%)	2/33 (6.1%)	0.275	0/11 (0%)	0.369	1/4 (25%)
Versamento pericardico /N°. (%)/	7/229 (3.1%)	1/34 (2.9%)	1.000	0/11 (0%)	1.000	0/2 (0%)
FE<55% /N°. (%)/	7/216 (3.2%)	1/31 (3.2%)	1.000	0/10 (0%)	1.000	0/3 (0%)
Blocchi di conduzione	7/205 (3.4%)	0/45 (0%)	0.357	0/18 (0%)	1.0000	

7.1.2. Pazienti ANA+ vs pazienti ANA-

E' stato effettuato il confronto tra i due gruppi (FR+/ANA+ e FR+/ANA-) ed è emersa una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda l'età d'insorgenza del fenomeno di Raynaud che risulta essere circa 4 anni più precoce nel gruppo con ANA+ (40.4 vs 36,5, p-value=0,023). Anche le donne sono risultate essere significativamente più numerose (92,1% vs 86,1%, p-value=0,04) nel gruppo ANA+. Non sono emerse

invece differenze significative riguardo alla durata del fenomeno di Raynaud. Il riscontro anamnestico di edema digitale e sintomi esofagei è risultato significativamente più frequente nel gruppo ANA+ (38.5% vs. 23.3%, p-value=0.001, e 35.2% vs. 18.4%, p-value<0.001, rispettivamente), mentre nessuna differenza è emersa nella frequenza di artralgie (15.5% vs. 16.0%, p-value=0.891). Differenze statisticamente significative sono state riscontrate anche nelle presenza di edema digitale al momento dell'arruolamento (9.8% vs. 3.4%, p-value=0.015), di digital pitting scars (4.7% vs. 0.7%, p=0.027), di telangettasie (12.3% vs. 1.4%, p-value<0.001) e di scleroderma pattern alla videocapillaroscopia (53.6% vs. 13.4%, p-value<0.001) risultate più frequenti nel gruppo ANA+. Differenze significative sono risultate anche nella distribuzione degli scleroderma pattern alla capillaroscopia, early (25% vs. 7%), active (26.6% vs. 7%) e late (2.6% vs. 0%) risultati più frequenti nel gruppo ANA+.

Gli autoanticorpi specifici per la sclerosi sistemica (ACA e anti.Scl70) e le alterazioni capillaroscopiche sono risultate presenti in più della metà dei pazienti ANA+. Il pattern ACTIVE è risultato due volte più frequente rispetto al pattern EARLY nel gruppo ANA+. Non sono state riscontrate differenze significative nel coinvolgimento degli organi interni o in altri parametri di laboratorio.

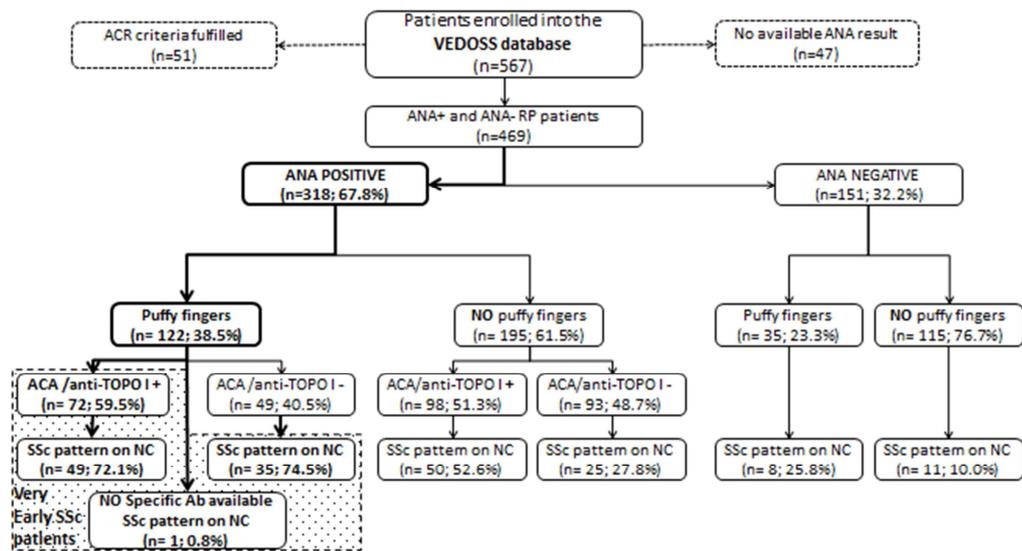
7.1.3. Manifestazioni cliniche nei pazienti ANA-

Il riscontro anamnestico di edema digitale è risultato nel 23,3% dei pazienti (35/150), nel 5,2% (8/35) di questi sono state riscontrate anche alterazioni capillaroscopiche. In altri 11 pazienti (7,2% di tutti i pazienti ANA-) sono state riscontrate anche alterazioni capillaroscopiche in assenza di pregresso edema digitale.

7.1.4. Pazienti con le “red flags” (ANA, FR, edema digitale) vs pazienti con FR/ANA+ senza edema digitale

Il 38,5% dei pazienti (122/318) con FR/ANA+ avevano anche edema digitale quindi tutte le “red flags”. Se confrontati con i pazienti FR/ANA+ senza edema digitale, i pazienti con le red flags avevano più frequentemente sclerodattilia (17.8 % and 6.2%, p-value=0.002), telangiectasie (17.3% vs. 9.2%, p-value=0.033), artralgie (23.9% vs. 10.2%, p-value= 0.001), e sintomi esofagei (42.1% vs. 30.9%, p-value= 0.043). Una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi è stata riscontrata anche nella frequenza delle alterazioni capillaroscopiche (73.2% vs 41.2%, p-value<0.001) risultate più frequenti nel gruppo di pazienti con edema digitale. Il pattern ACTIVE è risultato il più frequente in entrambi i gruppi (42% nei pazienti con le ‘red flags’, e 22.2% nei pazienti senza edema digitale). Il pattern LATE era più frequente nei pazienti con ‘red flags’ (12.0% vs. 4.7%), mentre la frequenza del pattern EARLY è risultata essere simile (17.2% vs. 14.2%). Nessuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi per quanto riguarda la frequenza degli autoanticorpi specifici per la SSc, in particolare nel gruppo con edema digitale erano presenti in 72 pazienti (59,5%): ACA in 55 pazienti, anti-Topo I in 17 pazienti. (Figura 7.1)

Figura 7.1



7.1.5. Pazienti con sclerosi sistemica molto precoce

108 pazienti (88.5% dei pazienti con le 'red flags') presentava i criteri per la diagnosi molto precoce di sclerosi sistemica: 72 pazienti presentavano positività per autoanticorpi specifici per la SSc e 35 avevano uno scleroderma pattern alla videocapillaroscopia. 49 pazienti (45.3%) avevano sia la positività degli autoanticorpi (ACA or anti-topo I) che uno scleroderma pattern alla capillaroscopia (Figure 7.1).

Alcune manifestazioni cliniche sono risultate più frequenti nei pazienti con sclerosi sistemica molto precoce se paragonate ai pazienti con FR/ANA+ : sclerodattilia (19.3% vs. 6.7%, p-value<0.001), telangiectasie (19.4% vs. 8.6%, p-value=0.007), artralgie in anamnesi (23.3% vs. 9.6%, p-value=0.001), artralgie al baseline (11.6% vs. 4.0%, p-value=0.013), scleroderma pattern alla capillaroscopia (81.5% vs. 38.0%, p-value<0.001).

7.1.6. Coinvolgimento degli organi interni in pazienti con sclerosi sistemica molto precoce

E' stato valutato il coinvolgimento degli organi interni mediante ecocolorodoppler cardiaco e Tc torace ad alta risoluzione, in 12 pazienti nel gruppo "red flags" che non presentavano né positività autoanticorpale (ACA e anti-SCI70) né alterazioni capillaroscopiche: in nessuno dei 12 pazienti sono stati rilevati segni di interessamento polmonare e cardiaco.

Nei 108 pazienti con sclerosi sistemica precoce invece sono stati riscontrati segni di coinvolgimento polmonare (fibrosi polmonare, vetro smerigliato) nel 13,8% (9/65) e segni di coinvolgimento cardiaco (ipertensione polmonare, disfunzione diastolica, versamento pericardico, riduzione della FE) nel 23,9% dei pazienti (21/88) (tabella n. 7.1.2)

Tabella 7.1.2

	Coinvolgimento degli organi interni (polmone/cuore)	Coinvolgimento polmonare (fibrosi polmonare/vetro smerigliato all'HRCT)	Coinvolgimento cardiaco (PAPs, FE ridotta, disfunzione diastolica, versamento pericardico)
ANA+ pazienti con FR, edema digitale (no antic. specifici , no SSC pattern	0/10 (0%)	0/5	0/10

alla capillarosc.) (n=12)			
Pazienti 'Very early systemic sclerosis' ('red flags + specifici Ab e/o SSc pattern alla capillaroscopia)(n= 108)	28/90 (31.1%)	9/65 (13.8%)	21/88 (23.9%)

7.1.7. Pazienti con FR/ANA+ con positività autoanticorpale (ACA o anti-SCI70)

In 170 pazienti FR/ANA+ (53,4%) è stata riscontrata una positività per gli ACA o gli anti-SCL70. La presenza di questi autoanticorpi era associata con maggior frequenza a sintomi esofagei [70/169 (41.4%) vs. 40/141 (28.4%), p-value=0.017], disfunzione diastolica (27/144 (18.8%) vs. 7/92 (7.6%), p-value =0.017], scleroderma pattern alla capillaroscopia [99/163 (60.7%) vs. 61/138 (44.2%), p-value =0.004] e edema digitale alla visita baseline [22/170 (12.9%) vs. 8/141 (5.7%), p-value =0.031]. La comparsa del fenomeno di Raynaud risultava 8 anni più tardi nei pazienti con positività di ACA o anti scl70 rispetto ai pazienti ANA+ senza anticorpi specifici.[44.1 anni (16.4 SD) vs 35.8 anni (14.6 SD), p-value <0.001].

7.2 RISULTATI SUI PAZIENTI VEDOSS DEL CENTRO DI FIRENZE PER QUANTO RIGUARDA IL COINVOLGIMENTO ESOFAGEO ANORETTALE

7.2.1. Pazienti

Sono stati valutati 59 soggetti di cui 58 erano donne (98,3%) 1 uomo (1,7%). In 4 pazienti non è stato possibile effettuare la manometria esofagea per scarsa tolleranza della procedura diagnostica.

7.2.2 Esofago e manometria esofagea

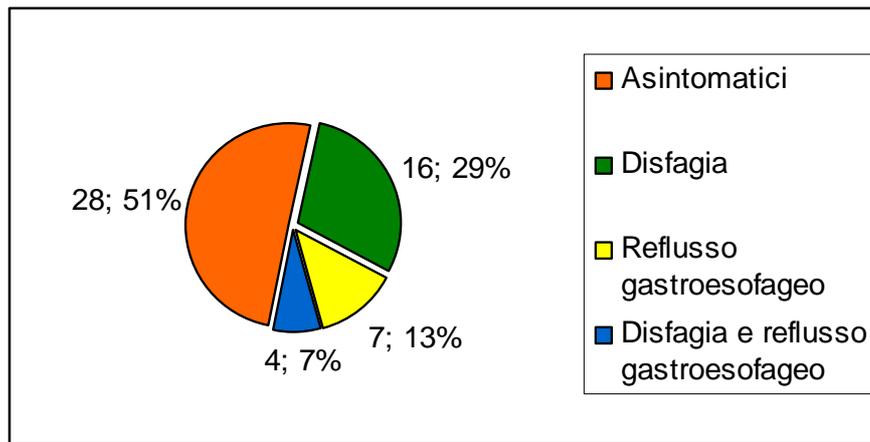
Dei 55 soggetti esaminati 27 erano sintomatici per un coinvolgimento gastro esofageo, in particolare 16 lamentavano disfagia, 7 denunciavano una sintomatologia tipica da reflusso gastroesofageo e 4 sia disfagia che sintomi da reflusso (grafico 7.2.1)

Le caratteristiche cliniche e/o demografiche della popolazione studiata sono mostrate nella tabella 7.2.1

Tabella 7.2.1.: Manifestazioni cliniche e strumentali dei pazienti studiati

Dati	Pazienti valutati mediante manometria esofagea (n=55)
Età	48,54±14,23
Durata del FR	6,58±7,33
Edema digitale	n=21/55 (38,18%)
Autoanticorpi:	
solo ANA	n=20/55 (36,36%)
ANA+ACA	n=24/55 (43,64%)
ANA+Scl70	n=11/55 (20%)
Ulcere digitali	n=13/55 (23,64%)
Capillaroscopia	
Pattern aspecifico	n=14/55 (25,45%)
Early scleroderma pattern	n=27/55 (49,09%)
Active scleroderma pattern	n=11/55 (20%)
Late scleroderma pattern	n=3/55 (5,45%)
Sintomi esofagei	n=27/55 (49,09%)

Grafico 7.2.1



Di seguito sono presentate tutte le statistiche descrittive relative sia al gruppo di pazienti con SSc molto precoce che dei controlli (n=24) che hanno eseguito la manometria esofagea; si riportano, per ogni parametro, il valore minimo, massimo riscontrati, la media (\pm deviazione standard) e la mediana (tabella 7.2.2).

Tabella 7.2.2

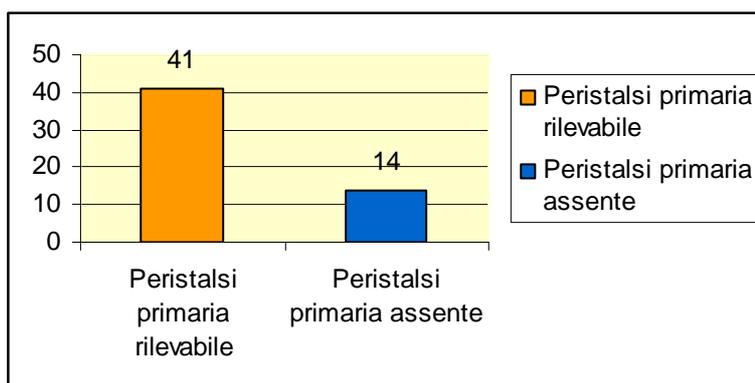
Parametro	Pazienti VeSSc					Controlli					P value
	Num pazienti	Valore minimo	Valore massimo	Media \pm ds	Mediana	Num pazienti	Valore minimo	Valore massimo	Media \pm ds	Mediana	
Pmax SEI (mmHg)	55	11	110,3	34,54 \pm 16,06	33	24	27,40	51,80	40,45 \pm 7,89	40,30	0,012
Pmed SEI (mmHg)	55	3	32,90	10,21 \pm 5,55	9,10	24	7,30	16,60	11,51 \pm 2,66	11,45	0,024
Velocità	41*	8,30	77,60	31,91	30	24	6,30	60,90	36,84	36,65	0,005

per (sec)				±14,74					±10,45		
Pmax Per (mmHg)	41*	14,90	91,40	43,47 ±20,09	38,80	24	53,60	93,50	69,14 ±10,11	69,40	<0,001
Pmed Per (mmHg)	41*	7,60	51,70	20,24 ±9,96	16,90	24	27,50	46,30	34,94 ±4,61	34,80	<0,001
Durata Per (sec)	41*	2,10	7,40	3,88 ±1,03	3,70	24	2,80	4,50	3,50 ±0,37	3,45	0,132 n.s.
Pmax SES (mmHg)	55	13,50	251,50	90,86 ±58,10	76,50	24	34	141,60	81,91 ±35,48	75,45	0,881 n.s.
Pmed SES (mmHg)	55	1	114,30	35,79 ±24,45	28,60	24	14,50	50,70	28,78 ±11,22	25,85	0,519 n.s.

Nota [*]: numero di pazienti nei quali è stato possibile valutare il parametro manometrico. In 14 pazienti su 55 la peristalsi è risultata assente e pertanto non rilevabile.

Per quanto riguarda la PERISTALSI ESOFAGEA, come è possibile osservare dalla tabella sopra riportata in ben 14 soggetti su 55 (25,45%) valutati con manometria esofagea non è stato possibile valutare la peristalsi esofagea, in quanto questa risultava essere assente. (grafico 7.2.2)

Grafico 7.2.2



Per quanto riguarda la **Pmax peristalsi** nei 41 soggetti in cui è stata possibile valutarla questa è risultata significativamente inferiore nei soggetti con VEDOSS se confrontati con i controlli ($p\text{-value}<0,001$).

Anche la **Pmed peristalsi**, anche questo parametro valutato su 41 soggetti, è risultato essere significativamente minore nei soggetti VEDOSS se confrontati con la popolazione sana di controllo con una $p\text{-value}<0,001$.

La **velocità della peristalsi primaria** è risultata significativamente inferiore nei soggetti VEDOSS con una $p\text{-value}=0,005$.

Come si può osservare dalla tabella che riporta i risultati della manometria esofagea, anche il TONO DELLO SFINTERE ESOFAGEO INFERIORE (SEI) è risultato essere statisticamente alterato nei pazienti VEDOSS se confrontati con i controlli sani.

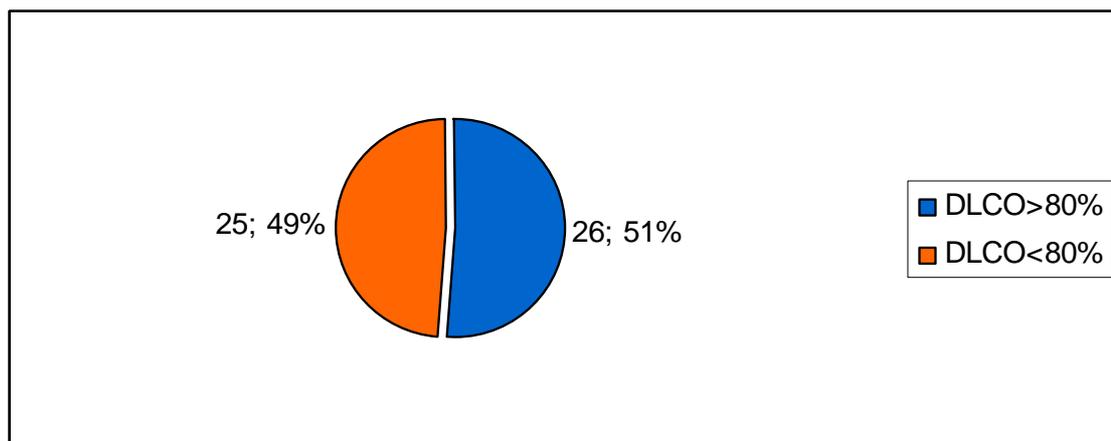
In particolare la **Pmax** appare essere significativamente inferiore nei pazienti con VEDOSS a confronto dei sani ($p\text{-value}=0,012$).

Per quanto riguarda il tono medio del SEI, **Pmed**, questo è risultato significativamente inferiore nei nostri pazienti con una ($p\text{-value}=0,024$).

Manometria esofagea e coinvolgimento polmonare

Dei 55 pazienti con VEDOSS 51 sono stati sottoposti a prove di funzionalità respiratoria (PFR) con DLCO: 26/51 hanno presentato un DLCO>80% e 25/51 un DLCO<80% (grafico 7.2.3).

Grafico 7.2.3



Tra le due popolazioni (DLCO>80% e DLCO<80%) non vi erano differenze statisticamente significative per quanto riguarda i parametri della manometria esofagea sia per quanto concerne la peristalsi che il tono del SEI.

Comunque se comparate con i controlli sani entrambe le popolazioni presentavano un'alterazione significativa della PERISTALSI (tabella 7.2.3).

Inoltre sia nella popolazione di pazienti VEDOSS con DLCO>80% che in quella con DLCO<80% non è stato possibile rilevare un'attività motoria esofagea in tutti i pazienti: rispettivamente in 8/26 pazienti con DLCO>80% (30,8%) ed in 6/25 con DLCO >80% (24%).

Tabella 7.2.3

Parametro	Confronto VEDOSS con DLCO>80% vs controlli	Confronto VEDOSS con DLCO<80% vs controlli
Vel peristalsi	0,005	0,156 n.s
Pmax peristalsi	<0,001	<0,001
Pmed Peristalsi	<0,001	<0,001
Pmax SEI	0,77 n.s	0,008
Pmed SEI	0,232 n.s.	0,008

Per quanto concerne invece il TONO DEL SEI si sono mostrati andamenti differenti nei due gruppi di popolazioni VEDOSS (DLCO>80% e DLCO<80%) se confrontati con i controlli sani. Infatti se i pazienti con DLCO<80% presentavano una **Pmax** e una **Pmed** significativamente più bassa che nella popolazione sana (rispettivamente $p\text{-value}=0,008$ e $p\text{-value}=0,008$) non si aveva lo stesso risultato nei nostri pazienti con DLCO>80%, che se comparati con i controlli sani non mostravano differenze statisticamente significative né nella Pmax che nella Pmed del SEI (tabella 7.2.4).

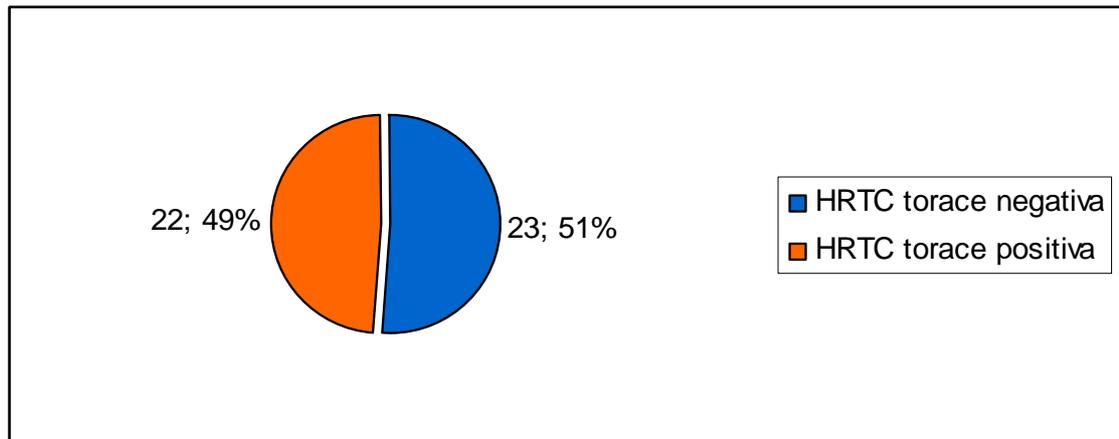
Tabella 7.2.4

Parametro	Pazienti VeSSc con DLCO>80 (n=26)				Controlli (n=24)				P-value
	Valore minimo	Valore massimo	Media±ds	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Media±ds	Mediana	
Pmax SEI (mmHg)	12	110,3	36,11 ±20,52	32,6	27,40	51,80	40,45 ±7,89	40,30	0,077 n.s
Pmed SEI (mmHg)	4,9	32,9	11,21 ±7,19	9,2	7,30	16,60	11,51 ±2,66	11,45	0,232 n.s

Parametro	Pazienti VeSSc con DLCO<80 (n=25)				Controlli (n=24)				P-value
	Valore minimo	Volre massimo	Media±ds	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Media±ds	Mediana	
Pmax SEI (mmHg)	11	52,50	32,54 ±10,75	33	27,40	51,80	40,45 ±7,89	40,30	0,008
Pmed SEI (mmHg)	3	17,70	9,21±3,46	8,7	7,30	16,60	11,51 ±2,66	11,45	0,008

Alcuni dei pazienti VEDOSS valutati con la manometria esofagea sono stati inoltre sottoposti a HRTC torace (n=45): 23/45 hanno mostrato una HRTC negativa per impegno interstiziale, mentre 22/45 hanno mostrato un coinvolgimento polmonare alla HRTC (come aree di ground glass, ispessimento dei setti intralobulari e interlobulari) (grafico 7.2.4).

Grafico 7.2.4



I pazienti provenienti da questi due gruppi (HRTC torace negativa vs HRTC torace positiva) non mostravano differenze statisticamente significative per quanto concerne i differenti parametri valutati alla manometria esofagea.

Entrambe le popolazioni se confrontate con i controlli sani mostravano un'alterazione significativa della peristalsi, come a dimostrare un già presente impegno esofageo (tabella 7.2.5).

Tabella 7.2.5

Parametro	Confronto VEDOSS con HRTC torace negativa vs popolazione di controllo	Confronto VEDOSS con HRTC torace positiva vs popolazione di controllo

Velocità peristalsi	0,019	0,05
Pmax peristalsi	<0,001	<0,001
Pmed Peristalsi	<0,001	<0,001

Inoltre in entrambi i gruppi si sono riscontrati soggetti in cui non è stato possibile valutare la peristalsi che risultava pertanto assente: rispettivamente in 8/23 pazienti con HRTC torace negativa (34,8%) e in 4/22 (18,2%) con HRTC torace positiva.

7.2.3 Manometria esofagea e segni clinici

Visti i numerosi studi riscontrabili nella letteratura in cui si indaga su una possibile correlazione tra quadro clinico del paziente e disturbi motori a carico dell'esofago, i parametri della manometria esofagea sono stati statisticamente correlati con specifiche caratteristiche cliniche del paziente:

- positività anticorpale (ANA, ACA, anti-Scl70);
- presenza di puffy fingers;
- pattern alla videocapillaroscopia (aspecifico, scleroderma early, active o late);
- presenza/assenza di sintomi clinici (GERD, disfagia);
- ulcere digitali

Nel nostro studio non è emersa alcuna correlazione statisticamente significativa tra i parametri valutati con la manometria esofagea e la presenza di ACA ($p\text{-value}>0,222$) o di antiScl70 ($p\text{-value}>0,103$), la durata del fenomeno di Raynaud ($p\text{-value}>0,271$), il quadro capillaroscopico ($p\text{-value}>0,12$), la presenza di ulcere digitali ($p\text{-value}>0,081$) e la presenza di puffy fingers ($p\text{-value}>0,79$).

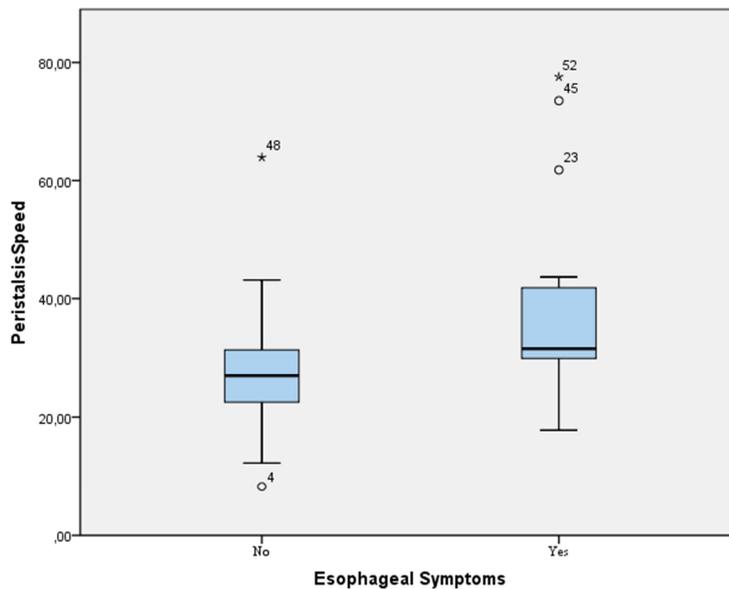
Per quanto concerne invece la presenza di sintomi esofagei (disfagia e/o sintomi da GERD) abbiamo osservato che tra i 14 pazienti che non presentavano peristalsi esofagea ben 12 (85,7%) lamentavano sintomi da coinvolgimento esofageo. Tuttavia si

è osservato che la **velocità della peristalsi** risultava significativamente minore con una $p\text{-value}=0,012$ nei pazienti senza sintomi esofagei. Quelli con sintomi mostravano invece un valore medio della velocità delle onde peristaltiche più vicina a quella dei controlli sani (tabella 7.2.6; grafico 7.2.5).

Tabella 7.2.6

	Sintomi esofagei	Valore minimo	Valore massimo	Media \pm ds	Mediana	p-value
Velocità della peristalsi	YES (n=15)	17,8	77,6	39,45 \pm 17,71	31,6	0,012
	NO (n=26)	8,3	63,9	27,57 \pm 10,87	26,95	

Grafico 7.2.5

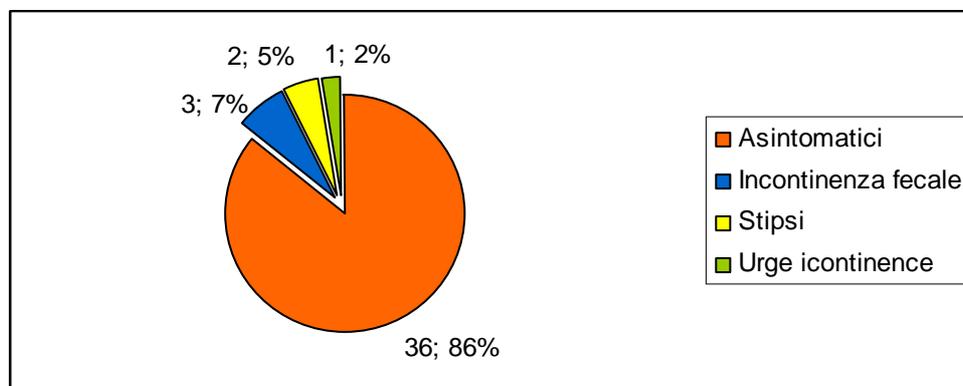


7.2.4. Anoretto e manometria anorettale

I soggetti con SSc molto precoce sottoposti a manometria anorettale sono stati 42; 17 pazienti hanno infatti rifiutato di eseguire l'esame per scarsa tolleranza della procedura.

Di questi 42 soggetti 36 non mostravano alcun sintomo correlabile con un coinvolgimento del tratto anorettale, mentre 6/42 (14,3%) mostravano sintomi anorettali, più precisamente: 3 pazienti lamentavano incontinenza, 2 pazienti stipsi ed 1 paziente denunciava un quadro di *urge incontnence* (grafico 7.2.6)

Grafico 7.2.6



Nella tabella 7.2.7 sono riportate le caratteristiche cliniche e strumentali dei pazienti sottoposti a manometria anorettale

Tabella 7.2.7: Manifestazioni cliniche e strumentali dei pazienti studiati

Dati	Pazienti sottoposti a manometria anorettale (n=42)
Età	51,74±12,48
Durata del Fenomeno di Raynaud	6,04±6,49
Puffy fingers	n=14/42 (33,33%)

Autoanticorpi	
solo ANA	n=13/42 (30,95%)
ANA+ACA	n=21/42 (50%)
ANA+Sci70	n=8/42 (19,04%)
Ulcere digitale	n=10/42 (23,81%)
Capillaroscopia	
Pattern aspecifico	n=11/42 (26,19%)
Early scleroderma pattern	n=19/42 (45,24%)
Active scleroderma pattern	n=10/42 (23,81%)
Late scleroderma pattern	n=2/42 (4,76%)
Sintomi anorettali	n=6/42 (14,29%)

Nella tabella 7.2.8 sono presentate tutte le statistiche descrittive relative sia del gruppo di pazienti con SSc molto precoce che dei controlli (n=21) che hanno eseguito la manometria anorettale; si riportano, per ogni parametro, il valore minimo, massimo riscontrati, la media (\pm deviazione standard) e la mediana.

Tabella 7.2.8

Parametri	VeSSc patients					Controlli					P value
	Num pazienti	Valore minimo	Valore massimo	Media \pm ds	Mediana	Num pazienti	Valore minimo	Valore massimo	Media \pm ds	Mediana	
P di riposo canale anale (4 cm) (mmHg)	42	0,00	28,70	3,32 \pm 5,46	1,35	21	3,80	44,40	18,48 \pm 10,67	19,60	<0,001
P di riposo canale anale (3 cm) (mmHg)	42	0,00	62,40	11,43 \pm 13,67	6,55	21	30	67,00	43,70 \pm 9,82	41,10	<0,001

P di riposo canale anale (2 cm) (mmHg)	42	3,00	96,60	28,98 ±23,18	23,60	21	43,40	90,80	63,26 ±13,17	60,80	<0,001
P di riposo canale anale (1 cm) (mmHg)	42	12,80	108,20	50,24 ±22,85	50,55	21	31	91,30	59,33 ±15,82	59,60	0,067 n.s
Pmax canale anale (mmHg)	42	21,40	185,40	77,82 ±31,22	80,40	21	56,80	120,20	86,49 ±19,14	86,70	0,141 n.s.
Pmed canale anale (mmHg)	42	10,30	75,60	37,48 ±14,23	38,35	21	35,80	59,60	46,15 ±6,42	44,50	0,010
CMV Pmax (mmHg)	42	12,20	155,60	71,69 ±39,01	68,10	21	29,40	211,60	106,71 ±52,12	108,50	0,017
CMV Pmed (mmHg)	42	8,00	107,80	44,59 ±23,25	39,80	21	24,50	161,80	73,14 ±37,57	76,10	0,005
CMV Durata (sec)	42	2,10	44,50	19,51 ±13,56	15,25	21	9,40	58,90	32,83 ±12,15	33,40	0,001
CMV Durata 50% (sec)	41*	1,10	41,10	12,88 ±12,65	6,30	21	1,80	51,30	24,32 ±15,34	20,40	0,003
CRST (ml)	42	20	180	68,33	60	21	40	60	51,90	60	0,315

				±38,38					±9,81		n.s.
CS (ml)	42	60	220	120 ±35,34	100	21	100	130	108,09 ±10,78	100	0,349 n.s.
MTV (ml)	42	100	300	192,86 ±36,65	180	21	140	210	179,52 ±12,84	180	0,229 n.s.

(*)= non in tutti e 42 i soggetti è stato riscontrato il parametro esaminato; la media di tale valore è stata fatta sul numero di soggetti in cui si è potuto misurare il parametro.

Per quanto riguarda la PRESSIONE del CANALE ANALE, si può osservare come la **Pressione di riposo a 4, 3 e 2 cm dal margine anale** risulti significativamente più bassa nei pazienti VEDOSS se comparati con la popolazione di controllo per i tre parametri con una $p\text{-value}<0,001$. Non risulta invece una differenza significativa nella pressione di riposo a 1 cm dal margine anale.

Anche la **Pmed del canale anale** appare significativamente minore nei nostri pazienti con una $p\text{-value}=0,010$.

Riguardo alla CONTRAZIONE MASSIMA VOLONTARIA (CMV), espressione dell'attività dello sfintere anale esterno, muscolo composto prevalentemente da muscolatura striata, anche la sua pressione massima e media (Pmax e Pmed) risultano significativamente alterate nella popolazione VEDOSS.

La **Pmax** della CMV si mostra significativamente diminuita nei nostri pazienti se confrontati con i controlli sani con una $p\text{-value}=0,017$.

La **Pmed**, al pari della pressione massima, risulta anche questa significativamente più bassa nei pazienti VEDOSS a paragone con la popolazione di controllo ($p\text{-value}=0,005$).

Per quanto concerne la CMV, non solo la pressione esercitata dallo sfintere anale esterno, ma anche la durata di tale contrazione appare statisticamente inferiore nella nostra popolazione di pazienti VEDOSS.

Infatti la **durata** della CMV risulta essere significativamente inferiore ($p\text{-value}=0,001$) nei pazienti con VeSSc al confronto dei controlli.

Lo stesso per quanto riguarda la **durata 50%** della CMV che sembra essere significativamente più bassa nei nostri pazienti con una $p\text{-value}=0,003$.

Non si sono invece osservate significative differenze circa il VOLUME DI SENSAZIONE RETTALE COSTANTE (Conscious Rectal Sensitivity Threshold –CRST-), la SENSAZIONE COSTANTE (Costant Sensation –CS-) ed il VOLUME MASSIMO TOLLERATO (Maximum Tolerable Volume –MTV-) tra i nostri pazienti e la popolazione di controllo, probabilmente in questi pazienti la sensazione rettale è ancora mantenuta.

7.2.5 Manometria anorettale e segni clinici

Come abbiamo fatto per l'esofago, le alterazioni motorie a livello del tratto anorettale sono state quindi correlate con le caratteristiche cliniche dei pazienti:

- positività anticorpale (ANA, ACA, anti-Scl70);
- presenza di puffy fingers;
- pattern alla videocapillaroscopia (aspecifico, scleroderma early, active o late);
- presenza/assenza di sintomi clinici (GERD, disfagia);
- ulcere digitali

Dal nostro studio non è emersa alcuna correlazione statisticamente significativa tra i parametri valutati con la manometria anorettale e la presenza di ACA ($p\text{-value}>0,066$) o la presenza di antiScl70 ($p\text{-value}>0,442$), la durata del fenomeno di Raynaud ($p\text{-}$

value>0,175), il quadro capillaroscopico (*p-value*>0,211), le presenza di ulcere digitali (*p-value*>0,268) e la presenza di puffy fingers (*p-value*>0,173).

La presenza di sintomi correlabile ad un coinvolgimento anorettale è, invece, risultata significativamente associata ad una minor pressione del canale anale, in particolare ad una più bassa **Pmax** e **Pmed** (tabella 7.2.9; grafici 7.2.7 e 7.2.8), mentre nessuna correlazione significativa è emersa dall'associazione tra presenza/assenza di sintomi anorettali e alterazione della contrazione massima volontaria, sia per quanto concerne la sua pressione (massima e media) e la sua durata.

Tabella 7.2.9

	Sintomi anorettali	Valore minimo	Valore massimo	Media ± ds	Mediana	p-value
Pmax canale anale (mmHg)	YES (n=6)	21,40	79,90	51,65±24,96	52,55	0,019
	NO (n=36)	35,00	185,40	82,18±30,26	84,85	
Pmed canale anale (mmHg)	YES (n=6)	10,30	42,90	25,93±12,91	24,55	0,039
	NO (n=36)	11,20	75,60	39,41±13,66	39,60	

Grafico 7.2.7

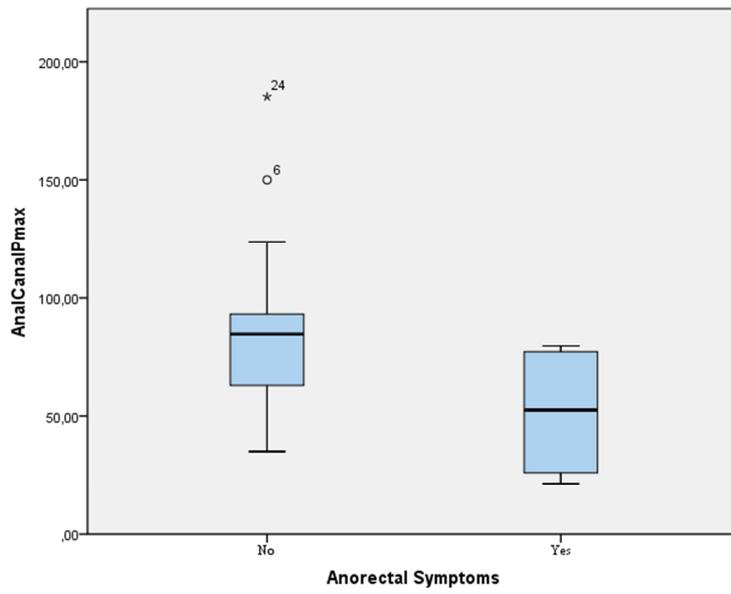
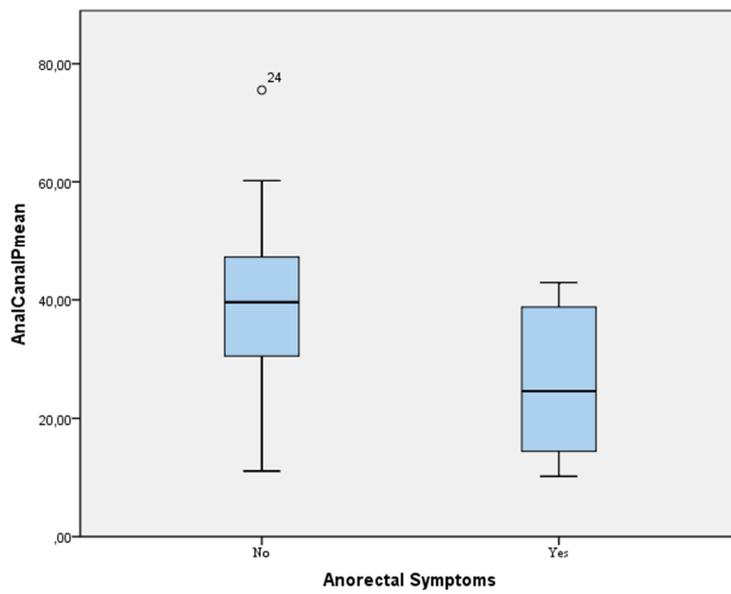


Grafico 7.2.8



7.3. RISULTATI SUI PAZIENTI VEDOSS DEL CENTRO DI FIRENZE PER QUANTO RIGUARDA IL COINVOLGIMENTO CARDIACO

7.3.1. Pazienti

Dei 165 pazienti che hanno eseguito ecocardiografia, 7 non hanno eseguito RMC per i seguenti motivi:

- 1 paziente: non compliance ad eseguire l'esame;
- 1 paziente: portatore di pacemaker cardiaco;
- 1 paziente: eccessive dimensioni corporee;
- 1 paziente: claustrofobia;
- 3 pazienti: motivi logistici.

Le caratteristiche cliniche e/o strumentali sono mostrate nelle tabelle 7.3.1, 7.3.2, 7.3.3, 7.3.4 e 7.3.5.

Tabella 7.3.1: caratteristiche cliniche e strumentali dei pazienti studiati

Caratteristiche Cliniche		Pazienti (n= 158)
Età (anni)		51,5 ± 13,6
Sesso	F	143/158 (90,5%)
	M	15/158 (9,5%)
Stadio di malattia	Very Early SSc	45/158 (28,5%)
	Early SSc	67/158 (42,4%)
	SSc	46/158 (29,1%)
Sottotipo	Diffusa	34/158 (21,5%)
	Limitata	124/158 (78,5%)

Durata della malattia (anni)		4,7 ± 5,8
Fenomeno di Raynaud		151/158 (95,6%)
Durata FR (anni)		8,34 ± 8,2
Capillaroscopia	Scleroderma pattern Early	65/158 (41,1%)
	Scleroderma pattern Active	52/158 (32,9%)
	Scleroderma pattern Late	41/158 (26%)
Autoanticorpi	ANA	150/158 (95%)
	ACA	71/158 (45%)
	Scl 70	52/158 (32,9%)
	Altro	6/158 (3,8%)
Modified Rodnan Skin Score		4,6 ± 7,5
Ulcere attive		19/158 (12%)
Ulcere in passato		55/158 (34,8%)
Ipertensione arteriosa		32 (20,3%)
Dislipidemia		30 (19%)
Diabete mellito		5 (3,2%)
Fumatore		32 (20,3%)
Ex-fumatore		46 (29,1%)
Classe NYHA		99/52/6/1

(I/II/III/IV)	
NT-proBNP (media) (mediana)	272,6 ± 590,5 116
Creatinina(media)(mediana)	0,73± 0,16 0,7
FEV1 (% predetto)	99,8% ± 19,2%
FEV1/FVC (% predetto)	89,8% ± 14,9%
TLC (% predetto)	95% ± 16,5%
VC (% predetto)	106,3% ± 20,8%
DLCO (% predetto)	74,6% ± 19,7%
DLCO/VA (% predetto)	82,2% ± 17,1%
HRCT Polmonare positiva	21/104 (20,2%)

Legenda:

ANA= anticorpi antinucleari; ACA= anticorpi anticentromero; Scl 70= anticorpi anti Scl 70;

NYHA= *New York Heart Association*; FVC= capacità vitale forzata espiratoria; FEV1= volume espiratorio forzato nel primo secondo; TLC= capacità polmonare totale; VC= capacità vitale;

DLCO= capacità di diffusione polmonare del monossido di carbonio; VA= volume alveolare;

HRCT= tomografia computerizzata ad alta risoluzione.

Tabella 7.3.2: caratteristiche cliniche e strumentali dei pazienti Very Early SSc

Caratteristiche Cliniche	Pazienti(n= 45)
--------------------------	-----------------

Età (anni)		52 ± 15,2
Sesso	F	43/45 (95,6%)
	M	2/45 (4,4%)
Durata della malattia (anni)		2,5 ± 2,6
Fenomeno di Raynaud		44/45 (97,8%)
Durata FR (anni)		7 ± 7,2
Capillaroscopia	Scleroderma pattern Early	31/45(68%)
	Scleroderma pattern Active	14/45 (32%)
	Scleroderma pattern Late	0/45 (0%)
Autoanticorpi	ANA	43/45 (95,5%)
	ACA	22/45 (48,9%)
	Scl 70	3/45 (6,7%)
	Altro	2/45(4,4%)
Ulcere attive		2/45 (4,4%)
Ulcere in passato		10/45 (22%)
Ipertensione arteriosa		9/45 (20%)
Dislipidemia		8/45 (17,8%)
Diabete mellito		3/45 (6,7%)
Fumatore		10/45 (22,2%)

Ex-fumatore	12/45 (26,7%)
Classe NYHA (I/II/III/IV)	28/17/0/0
NT-proBNP (media) (mediana)	116 ± 120 75
Creatinina(media)	0,71 ± 0,11
FEV1 (% predetto)	104,8 % ±18,5 %
FEV1/FVC (% predetto)	92,4% ± 16%
TLC (% predetto)	96,5% ±16,6%
VC (% predetto)	108,3% ±21,9%
DLCO (% predetto)	80% ±16,8%
DLCO/VA (% predetto)	84,4% ±12,3%
HRCT polmonare positiva	0/45

Tabella 7.3.3: caratteristiche cliniche e strumentali dei pazienti Early SSc

Caratteristiche Cliniche		Pazienti (n= 67)
Età (anni)		52 ± 12
Sesso	F	58/67 (87%)
	M	9/67 (13%)
Sottotipo	Diffusa	14/67 (21%)
	Limitata	53/67 (79%)
Durata della malattia (anni)		3 ± 5

Fenomeno di Raynaud		64/67 (95,5%)
Durata FR (anni)		7 ± 8
Capillaroscopia	Scleroderma pattern Early	32/67 (47%)
	Scleroderma pattern Active	26/67 (33%)
	Scleroderma pattern Late	9/67 (7,5)
Autoanticorpi	ANA	66/67 (98%)
	ACA	28/67 (89,6%)
	Scl 70	27/67 (40,3%)
	Altro	1/67(1,5%)
Modified Rodnan Skin Score		2 ±4
Ulcere attive		5/67 (7,5%)
Ulcere in passato		23/67 (34%)
Ipertensione arteriosa		11/67 (16,4%)
Dislipidemia		14/67 (21%)
Diabete mellito		1/67 (1,5%)
Fumatore		17/67 (25,4%)
Ex-fumatore		23/67 (34,3%)
Classe NYHA (I/II/III/IV)		46/21/0/0

NT-proBNP (media) (mediana)	156± 157,5 116
Creatinina(media) (mediana)	0,74 ±0,19 0,7
FEV1 (% predetto)	101,9% ±16,4%
FEV1/FVC (%predetto)	89% ±15%
TLC (% predetto)	97,7% ±13,6%
VC (% predetto)	109,6% ±17,5%
DLCO (% predetto)	78% ±19,2%
DLCO/VA (% predetto)	83,9% ±17,5%
HRCT polmonare positiva	0/67

Tabella 7.3.4: caratteristiche cliniche e strumentali dei pazienti SSc

Caratteristiche Cliniche		Pazienti (n= 46)
Età (anni)		52,5 ± 14
Sesso	F	42/46 (91%)
	M	4/46 (9%)
Sottotipo	Diffusa	18/46 (39%)
	Limitata	28/46 (61%)
Durata della malattia (anni)		9,5 ±7
Fenomeno di Raynaud		43/46 (93,5%)

Durata FR (anni)		11,5 ±9
Capillaroscopia	Scleroderma pattern Early	0/46 (0%)
	Scleroderma pattern Active	16/46 (35%)
	Scleroderma pattern Late	30/46 (65%)
Autoanticorpi	ANA	43/46 (93%)
	ACA	11/46 (24%)
	Scl 70	22/46 (47%)
	Altro	3/46(6%)
Modified Rodnan Skin Score		12± 10
Ulcere attive		12/46 (26%)
Ulcere in passato		22/46 (47,8%)
Ipertensione arteriosa		12/46 (26%)
Dislipidemia		8/46 (17,4%)
Diabete mellito		1/46 (2,2%)
Fumatore		5/46 (%)
Ex-fumatore		11/46 (24%)
Classe NYHA (I/II/III/IV)		16/17/6/1
NT-proBNP (media) (mediana)		579± 1013 180

Creatinina(media) (mediana)	0,74 ± 0,18 0,7
FEV1 (% predetto)	90,2% ±22,2%
FEV1/FVC (% predetto)	88,3% ±13,7%
TLC (% predetto)	87,9% ±20%
VC (% predetto)	97,5% ±23,9%
DLCO (% predetto)	63,4% ±19,5%
DLCO/VA (% predetto)	75,8% ±20,3%
HRCT Polmonare positiva	21/28 (75%)

7.3.2 Ecocardiografia

Tutti i 165 pazienti hanno eseguito esame ecocardiografico. Sono stati esclusi dall'analisi statistica i 7 pazienti che non hanno eseguito RMC.

Di seguito sono presentate le statistiche descrittive dei pazienti che hanno eseguito ecocardiografia.

Tabella 7.3.5: Parametri ecocardiografici basali nei pazienti studiati

Parametri	Pazienti (n= 158)
FE (%)	63,1 ± 5,8
PAPs (mmHg)	27,7 ± 7,5
LVEDD (mm)	43,5 ± 4,4
LVESD (mm)	28,1 ± 4,4

IVS (mm)		9 ± 1,8
LVPW (mm)		8,5 ± 1,5
WMSI	1	156
	2	2
LA volume (ml)		44,3 ± 15,4
MAPSE (mm)		15,4 ± 2,8
TAPSE (mm)		22,4 ± 4,2
DT (msec)		194,5 ± 48,4
E/A mitralico		1,29 ± 0,54
E/E'		8,4 ± 2,85
TDI sistolico anulus mitralico (cm/sec)		9,36 ± 2
TDI sistolico anulus tricuspidalico(cm/sec)		13,5 ± 2,7
E'/A' destro		0,93 ± 0,4
MPI (TEI index del ventricolo destro)		0,39 ± 0,19
Versamento pericardico		19/158 (12%)
Insufficienza tricuspidalica	minima	48 (30%)
	lieve	36 (23%)
	moderata	9 (6%)

Legenda:

FE= frazione di eiezione; PAPs= pressione arteriosa polmonare sistolica; LVEDD= diametro del ventricolo sinistro in diastole; LVESD= diametro del ventricolo sinistro in sistole; IVS= spessore del setto interventricolare; LVPW= spessore della parete posteriore del ventricolo sinistro; WMSI= *wall motion score index*; MAPSE= escursione sistolica dell'anello mitralico; TAPSE= escursione sistolica dell'anello tricuspidalico; DT= tempo di decelerazione; E= onda E; A= onda A; E'= velocità protodiastolica di picco; TDI= *tissue doppler imaging*; MPI= *myocardial performance index*; LA= atrio sinistro; LV= ventricolo sinistro; RV= ventricolo destro; RA= atrio destro

Nel gruppo Very Early SSc il valore medio del TAPSE è stato di 22,7 \pm 4 mm e il valore medio della FE di 64,1 \pm 5 %.

Nel gruppo Early SSc il valore medio del TAPSE è stato di 22,7 \pm 3,6 mm e il valore medio della FE di 64 \pm 5,6 %.

Nel gruppo SSc il valore medio del TAPSE è stato di 21,7 \pm 5,1 mm e il valore medio della FE di 60,6 \pm 6,2 %.

7.3.3 Risonanza magnetica cardiaca con mezzo di contrasto

Dei 158 pazienti che hanno eseguito RMC, 6 non hanno potuto eseguire la somministrazione di mezzo di contrasto e.v. con Gadolinio-DTPA per impossibilità di reperire un accesso venoso.

Di seguito sono presentate le statistiche descrittive dei pazienti che hanno eseguito RMC con mezzo di contrasto.

Tabella 7.3.6 Statistiche descrittive dei valori alla risonanza magnetica cardiaca

Parametri	Valore minimo	Valore massimo	Media \pm ds
VTDI VS (ml/m ²)	33	115	70 \pm 13,4
VTSI VS (ml/m ²)	5	60	23,1 \pm 8,9
MVI (g/m ²)	30	107	56,9 \pm 12,6
FE VS (%)	44	86	67,5 \pm 7,7
SVI VS (ml/m ²)	25	69	47,4 \pm 8,4
OCS (L/min)	3,0	47,0	6,3 \pm 4,5
IC (L/min/m ²)	2,0	6,6	3,5 \pm 0,8
VTDI VD (ml/m ²)	32	114	69,7 \pm 15,4
VTSI VD (ml/m ²)	8	71	25 \pm 10,5
FE VD (%)	36	84	65,9 \pm 7,6
SVI VD (ml/m ²)	7	98	48,3 \pm 11,7
OCD (L/min)	2,9	11,0	5,7 \pm 1,4
AS area	10	38	20,2 \pm 4,6

AD area	11	30	17,9 ± 3,5
Edema miocardico	3/158 (1,9%)		
Delayed enhancement	41/ 152 (27%)		

Legenda:

VTDI VS= volume telediastolico indicizzato ventricolo sinistro;

VTSI VS= volume telesistolico indicizzato ventricolo sinistro;

MVI= massa ventricolare indicizzata;

FE VS= frazione d'iezione ventricolo sinistro;

SVI VS= stroke volume indicizzato ventricolo sinistro;

OCS= output cardiaco sinistro;

IC= indice cardiaco;

VTDI VD= volume telediastolico indicizzato ventricolo destro;

VTSI VD= volume telesistolico indicizzato ventricolo destro;

FE VD= frazione d'iezione ventricolo destro;

SVI VD= stroke volume indicizzato ventricolo destro;

OCD= output cardiaco destro;

AS= atrio sinistro;

AD= atrio destro.

41 pazienti su 152 (27%), presentavano alle immagini tardive T1-pesate *fast gradient echo inversion-recovery* dopo somministrazione di MdC paramagnetico, presenza di

alterazioni di segnale (enhancement tardivo) a carico del miocardio, suggestive di aree di fibrosi sostitutiva.

I pazienti con diagnosi di Very Early SSc erano 44 e di questi ben 7/44 (15,9%) presentavano fibrosi miocardica nonostante la precocissima fase di malattia, a dimostrazione del fatto che il coinvolgimento cardiaco è un evento precoce nell'evoluzione della malattia anche se non dà segni della sua presenza, almeno in fase iniziale.

65 pazienti avevano diagnosi di Early SSc e 20/65 (30,7%) avevano un iniziale coinvolgimento cardiaco dimostrato dalla presenza di DE del gadolinio nonostante la fase precoce di malattia.

I pazienti con diagnosi di SSc conclamata erano 43, e all'interno di questo gruppo 14/43 (32,5%) presentavano DE.

Dei 158 pazienti che hanno eseguito RMC, 3 hanno mostrato edema miocardico a carico del ventricolo sinistro e del setto interventricolare, alle immagini *black-blood* T2-pesate STIR *fast spin echo* con soppressione del segnale del tessuto adiposo. Questi 3 pazienti avevano diagnosi rispettivamente di Very Early SSc, Early SSc e SSC. L'ecocardiogramma di questi soggetti mostrava normale funzione biventricolare sisto-diastolica, in assenza di valvulopatie significative.

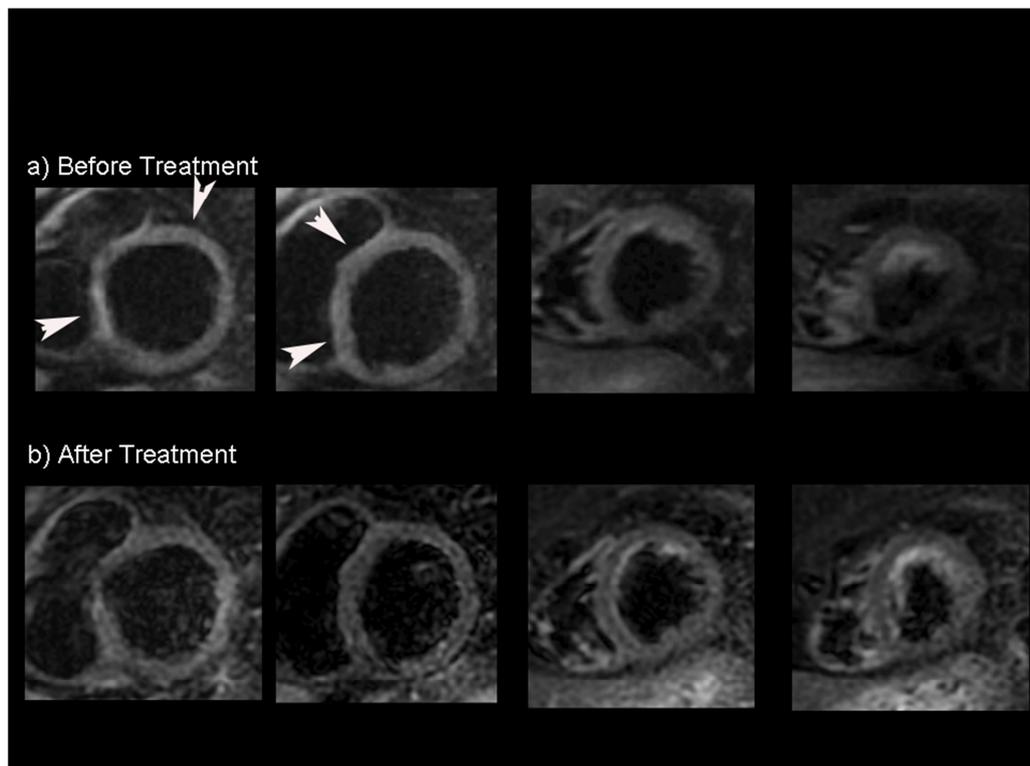
Alle immagini di RMC è stata confermata la normalità dei volumi del ventricolo sinistro e della funzione sisto-diastolica regionale e globale con normale frazione d'eiezione e la presenza di edema miocardico.

Nella paziente con diagnosi di Early SSc, oltre alla presenza di edema miocardico, la RM del torace ha evidenziato, grazie ad immagini T2-pesate con soppressione del tessuto adiposo, la presenza di un'area di iperintensità del segnale a livello dei campi polmonari medi e inferiori, suggestiva di processo infiammatorio attivo, coinvolgente sia il miocardio che il polmone.

La paziente non mostrava alcun segno o sintomo di interessamento cardiopolmonare; troponina I, NT-proBNP, velocità di eritrosedimentazione e proteina C reattiva erano nella norma.

Visto l'interessamento cardiopolmonare acuto, la paziente è stata trattata con metilprednisolone pulsato (1 g/m² e.v. per tre giorni consecutivi, seguito da 20 mg intramuscolo per 30 giorni per poi passare a 4 mg/die). La paziente è stata sottoposta a RM dopo 3 e 6 mesi, mostrando invariati i volumi del ventricolo sinistro con normali indici di funzione sistolica regionale e globale biventricolare, mentre l'iperintensità di segnale delle immagini T2-pesate era drasticamente ridotta sia a livello miocardico, sia a livello polmonare rispetto alle immagini prima del trattamento (Figura 7.3)

Figura 7.3



7.3.4. Correlazione risonanza magnetica cardiaca, dati clinici e strumentali

Sono stati indagati i possibili correlati clinico-strumentali della presenza di DE (tabella 7.3.7).

Tra i dati analizzati è stata riscontrata un'associazione statisticamente significativa tra storia di ulcerazioni digitali e presenza di DE (p-value= 0,021).

Inoltre la diffusione alveolo capillare del monossido di carbonio è risultata inferiore nei pazienti che presentavano DE con un valore di probabilità statisticamente significativo (p-value= 0,05).

Non è emersa alcuna associazione statisticamente significativa tra i restanti parametri clinico-strumentali e la presenza di DE.

Tabella 7.3.7 Correlazione dati clinici e strumentali con la presenza di DE alla RMC con m.d.c. (152 pazienti).

	Delayed enhancement assente	Delayed enhancement presente	p-value
Età	51,4 ± 13,6	52 ± 13,3	0,821
Sesso maschile	11/15	4/15	1
Sesso femminile	100/137	37/137	
Very early SSC	37/44	7/44	0,069
Early SSC	45/65	20/65	0,46
SSc	29/43	14/43	0,41
Variante limitata	90/121	31/121	0,65
Variante diffusa	21/31	10/31	0,49

Durata di malattia (anni)	4,4 ± 5,7	4,7 ± 5,1	0,69
Scleroderma pattern			
Early	50/63	13/63	0,19
Active	33/50	17/50	0,13
Late	28/39	11/39	0,83
SCL-70 positività	34/50	16/50	0,32
ACA positività	43/58	15/58	0,85
mRSS	4 ± 7	5 ± 7	0,46
Ulcere attive	13/18	5/18	1
Ulcere in passato	33/53	20/53	0,021*
DLCO	76,3% ± 19,2%	68,8% ± 18,7%	0,05*
ILD	37/52	15/52	0,65
Ipertensione arteriosa	24/30	6/30	0,49
Dislipidemia	21/29	8/29	1
Diabete mellito	3/5	2/5	0,61
Fumatore	25/32	7/32	0,51
Ex-fumatore	33/47	14/47	0,69
CCB	25/35	10/35	0,66

Legenda:

ILD= interstitial lung disease; CCB= calcium channel blockers(calcio antagonisti diidropiridinici).

* = p<0.05

E' stata eseguita anche l'analisi statistica tra i parametri clinico strumentali e la presenza di DE nei vari sottogruppi (Very Early SSc, Early SSc e SSc).

Non è emersa alcuna correlazione statisticamente significativa nei diversi stadi di malattia considerati singolarmente (tabelle 7.3.8a, 7.3.8b, 7.3.8c).

Tabella 7.3.8a Correlazione dati clinici e strumentali con la presenza di DE alla RMC con m.d.c. (gruppo Very Early SSc, 44 pazienti)

	Delayed enhancement assente	Delayed enhancement presente	p-value
Età	50,8± 14,5	48 ± 18,5	0,72
Sesso maschile	2/2	0/2	
Sesso femminile	35/42	7/42	0,7
Durata di malattia (anni)	2,6 ± 2,6	2,4± 2,9	0,88
Scleroderma pattern			
Early	26/30	4/30	0,66
Active	11/14	3/14	0,66
Late	0	0	
SCL-70 positività	3/3	0/3	1
ACA positività	16/21	5/21	0,23
Ulcere attive	2/2	0/2	1
Ulcere in passato	1/10	3/10	0,159
DLCO	81,4% ± 16,4%	69,8%± 15,6%	0,143
Ipertensione arteriosa	7/9	2/9	0,61
Dislipidemia	7/8	1/8	1
Diabete mellito	1/3	2/3	0,06
Fumatore	9/10	1/10	1

Ex-fumatore	9/12	3/12	0,33
CCB	6/9	3/9	0,15

Tabella 7.3.8b Correlazione dati clinici e strumentali con la presenza di DE alla RMC con m.d.c. (gruppo Early SSc, 65 pazienti)

	Delayed enhancement assente	Delayed enhancement presente	p-value
Età	51,8 ± 12,9	52,1 ± 9,5	0,9
Sesso maschile	5/9	4/9	0,44
Sesso femminile	40/56	16/56	
Variante limitata	37/52	15/52	0,51
Variante diffusa	8/13	5/13	0,51
Durata di malattia (anni)	2,7 ± 4,5	2,8 ± 3,3	0,86
Scleroderma pattern			
Early	24/32	8/32	0,42
Active	17/28	11/28	0,27
Late	4/5	1/5	1
SCL-70 positività	16/27	11/27	0,16
ACA positività	21/26	5/26	0,16
mRSS	1 ± 3	5 ± 5,9	0,08
Ulcere attive	3/5	2/5	1
Ulcere in passato	14/22	8/22	0,5
DLCO	80%± 19%	73%± 18%	0,15
Ipertensione arteriosa	8/10	2/10	0,7

Dislipidemia	8/13	5/13	0,5
Diabete mellito	1/1	0/1	1
Fumatore	12/17	5/17	1
Ex-fumatore	15/23	8/23	0,7
CCB	12/15	3/15	0,5

Tabella 7.3.8c Correlazione dati clinici e strumentali con la presenza di DE alla RMC con m.d.c. (gruppo SSc, 43 pazienti)

	Delayed enhancement assente	Delayed enhancement presente	p-value
Età	51,5 ± 14	53,5 ± 15,5	0,68
Sesso maschile	4/4	0/4	0,28
Sesso femminile	25/39	14/39	
Variante limitata	18/27	9/27	1
Variante diffusa	11/16	5/16	
Durata di malattia (anni)	9,4 ± 7	8,9 ± 5,8	0,8
Scleroderma pattern			
Early	0	0	
Active	8/12	4/12	1
Late	20/30	10/30	1
SCL-70 positività	15/20	5/20	0,51
ACA positività	6/11	5/11	0,45
mRSS	12 ± 11	10 ± 9	0,65
Ulcere attive	8/11	3/11	1
Ulcere in passato	12/21	9/21	0,129

DLCO	65,6% ± 18%	57% ± 21%	0,35
ILD	17/21	4/21	0,6
Ipertensione arteriosa	9/11	2/11	0,29
Dislipidemia	6/8	2/8	1
Diabete mellito	1/1	0/1	1
Fumatore	4/5	1/5	1
Ex-fumatore	9/12	3/12	0,71
CCB	7/11	4/11	0,69

7.3.5 Correlazione risonanza magnetica cardiaca ed ecocardiogramma

La presenza o assenza di DE del gadolinio alla RMC è stata correlata con i parametri ecocardiografici, in modo da poter valutare se ci fosse qualche associazione fra il coinvolgimento cardiaco studiato con le due differenti tecniche. Inoltre è stato valutato se ci fossero parametri ecocardiografici sensibili e precoci nel rilevare un iniziale interessamento cardiaco come il DE della RMC (tabella 7.3.9a).

Valori significativamente più bassi di FE sono stati riscontrati nei pazienti con DE ($p < 0,05$), per quanto sempre nei limiti della norma.

Valori significativamente più bassi di TAPSE sono stati riscontrati nei pazienti con DE ($p < 0,004$), per quanto sempre nei limiti della norma.

Non sono emerse altre associazioni statisticamente significative.

Tabella 7.3.9a Correlazione parametri ecocardiografici con DE del gadolinio (152 pazienti)

Parametri	Delayed	Delayed	p-value
-----------	---------	---------	---------

ecocardiografici	enhancement assente	enhancement presente	
FE (%)	63,7 ± 5,7	61,5 ± 6	0,05*
PAPs (mmHg)	27,3 ± 7,1	28,25 ± 9,4	0,76
LVEDD (mm)	43,4 ± 4,5	43,8 ± 4,1	0,59
LVESD (mm)	28,1 ± 4,2	28,4 ± 4,8	0,81
IVS (mm)	9 ± 1,8	8,9 ± 1,8	0,75
LVPW (mm)	8,4 ± 1,3	8,4 ± 2	0,86
LA volume (ml)	42,5 ± 14,5	47,9 ± 16,4	0,1
MAPSE (mm)	15,5 ± 2,7	15,2 ± 2,6	0,49
TAPSE (mm)	23 ± 4,2	21 ± 3,6	0,004*
DT (msec)	193,4 ± 50,9	198,1 ± 40	0,58
E/A mitralico	1,29 ± 0,51	1,30 ± 0,59	0,95
E/E'	8,3 ± 2,6	8,6 ± 3,4	0,55
TDI sistolico annulus mitralico (cm/sec)	9,5 ± 2,1	8,9 ± 2	0,13
TDI sistolico annulus tricuspidalico (cm/sec)	13,7 ± 2,8	13 ± 2,5	0,14
E'/A' destro	0,90 ± 0,35	1,02 ± 0,51	0,2
MPI (TEI index del ventricolo destro)	0,39 ± 0,17	0,40 ± 0,24	0,8

Legenda:

FE= frazione di eiezione; PAPs= pressione arteriosa polmonare sistolica; LVEDD= diametro del ventricolo sinistro in diastole; LVESD= diametro del ventricolo sinistro in sistole; IVS= spessore del setto interventricolare; LVPW= spessore della parete posteriore del ventricolo sinistro; MAPSE= escursione sistolica dell'anello mitralico; TAPSE= escursione sistolica dell'anello tricuspidalico;

DT= tempo di decelerazione; E= onda E; A= onda A; E'= velocità protodiastolica di picco; TDI= *tissue doppler imaging*; MPI= *myocardial performance index*; LA= atrio sinistro; LV= ventricolo sinistro; RV= ventricolo destro; RA= atrio destro.

*= $p < 0,05$

Avendo riscontrato valori di TAPSE e di FE più bassi nei pazienti con DE nella popolazione totale, abbiamo cercato una correlazione tra tutti i parametri ecocardiografici e DE nei diversisottogruppi di pazienti (Very Early SSc, Early SSc e SSc) (tabelle 7.3.9b, 7.3.9c, 7.3.9d).

Nelle tabelle è stata riportata la sola correlazione tra FE, TAPSE e DE. Non è emersa alcuna correlazione significativa tra i parametri analizzati.

Tabella 7.3.9b Correlazione parametri ecocardiografici con DE del gadolinio (gruppo Very Early SSc 43 pazienti).

Parametri ecocardiografici	Delayed enhancement assente	Delayed enhancement presente	p-value
FE (%)	64,5 ± 4,6	62 ± 6,7	0,36
TAPSE (mm)	23,1 ± 4,2	20,7 ± 2,7	0,073

Tabella 7.3.9c Correlazione parametri ecocardiografici con DE del gadolinio (gruppo Early SSc 65 pazienti).

Parametri ecocardiografici	Delayed enhancement assente	Delayed enhancement presente	p-value
FE (%)	64,6 ± 5,6	62,6 ± 5,7	0,22
TAPSE (mm)	23,1 ± 3,6	21,4 ± 3,2	0,069

Tabella 7.3.9d Correlazione parametri ecocardiografici con DE del gadolinio (gruppo SSc 43 pazienti).

Parametri ecocardiografici	Delayed enhancement assente	Delayed enhancement presente	p-value
FE (%)	61,1± 6,6	59,8± 6,1	0,51
TAPSE (mm)	22,7 ± 5,1	20,4 ± 4,6	0,15

PARTE TERZA

8. DISCUSSIONE

Questo studio ha analizzato un'ampia casistica a livello europeo di pazienti affetti da fenomeno di Raynaud evidenziando i pazienti che presentavano diagnosi di Sclerosi Sistemica in fase molto precoce di malattia e classificando le caratteristiche cliniche di tali pazienti in un database ampio e specifico che porterà anche ad una rivalutazione epidemiologica della casistica. Inoltre il nostro centro di Firenze ha voluto accuratamente studiare i pazienti in fase very early di malattia, cercando di mettere in evidenza i primi organi colpiti aprendo in tal modo una "window of opportunity" di terapia per pazienti che fino ad oggi non avevano possibilità di essere curati nella fase precoce edematosa ed infiammatoria della malattia, ma solo nella fase più tardiva ed ormai di end stage degli organi interni cioè quella di fibrosi. Per tale motivo i pazienti arruolati nel centro di Firenze sono stati sistematicamente sottoposti a manometria esofagea ed anorettale, Tc torace ad alta risoluzione e prove di funzionalità respiratoria con misurazione del DLCO, ecocolordoppler cardiaco con misurazione delle pressioni polmonari, RM cuore.

I risultati preliminari della casistica a livello europeo sembrano confermare la validità dei criteri proposti da EUSTAR per la diagnosi molto precoce di sclerosi sistemica. E' emerso infatti che la positività degli ANA in pazienti con fenomeno di Raynaud risulta spesso associata alla presenza di edema digitale ed alterazioni specifiche alla capillaroscopia, telangiectasie, sintomi esofagei, ulcere digitali, digital pitting scars già alla prima visita. E' stato riscontrato inoltre che più di un terzo dei pazienti con tutte le "red flags" (ANA+, FR, e edema digitale) presenta più spesso alterazioni specifiche alla capillaroscopia, rispetto ai pazienti senza edema digitale, oltre che una positività

degli anticorpi specifici della SSc (ACA e anti-SCI70) nel 90% dei casi potendo quindi già essere posta, per questi pazienti, diagnosi di SSc molto precoce. La validità dei criteri proposti è anche supportata dal fatto che se paragonati ai pazienti con il solo FR e la positività degli ANA i pazienti con ANA+, FR, e edema digitale hanno presentato più frequentemente anche i segni caratteristici della SSc conclamata sclerodattilia (19.3% vs. 6.7%, $p<0.001$), telangiectasie (19.4% vs. 8.6%, $p=0.005$), e scleroderma pattern alla capillaroscopia (81.5% vs. 38.0%, $p<0.001$).

Questo studio ha quindi messo chiaramente in evidenza l'importanza dell'edema digitale nell'identificare i pazienti con sclerosi sistemica molto precoce. Circa il 90% dei pazienti con fenomeno di Raynaud e ANA+ con edema digitale in anamnesi presentava già uno scleroderma pattern alla capillaroscopia e/o anticorpi specifici della sclerosi sistemica (ACA o anti-topo I). I nostri dati suggeriscono inoltre che i pazienti con ANA- ed edema digitale dovrebbero essere seguiti con un follow up stretto in quanto il 20% dei nostri pazienti con queste caratteristiche, (5% di tutti i pazienti ANA-) presentava anche sclerodattilia e altri segni di sclerosi sistemica (scleroderma pattern alla capillaroscopia, sintomi esofagei).

Sembra quindi che sebbene l'edema digitale presente in anamnesi possa risolversi nel corso della storia di un paziente con fenomeno di Raynaud e ANA- identifichi comunque pazienti a maggior rischio di sviluppare in seguito altri segni di sclerosi sistemica.

La presenza di autoanticorpi specifici sembrano inoltre associati con l'insorgenza più tardiva di FR e con alcune manifestazioni precoci di coinvolgimento degli organi interni, come sintomi esofagei e disfunzione diastolica.

Il riscontro di una durata del FR relativamente lunga in entrambi i gruppi (ANA + e ANA-) al momento dell'arruolamento nello studio (in media 4 anni e 5 anni, rispettivamente) potrebbe influenzare la possibilità di individuare i casi di SSc molto

precoci tra i pazienti arruolati, aumentando invece la possibilità di identificare i pazienti con malattia in fase precoce e quindi già con un coinvolgimento d'organo.

Il nostro studio ha mostrato che circa il 30% dei pazienti presentano già un coinvolgimento cardiaco e/o polmonare alla valutazione strumentale (ecocolordoppler cardiaco, Tc torace ad alta risoluzione) per cui è possibile porre diagnosi di SSc precoce, (criteri VEDOSS + coinvolgimento d'organo). Questo risultato è in accordo con l'analisi più recente proposta da un unico centro che ha dimostrato come lo screening con strumenti sensibili per coinvolgimento degli organi interni nei pazienti affetti da SSc precoce può identificare un coinvolgimento pre-clinico degli organi nel 42-48% dei casi (Valentini G. et al., 2012; Valentini G, et al., 2011). La mancanza di una differenza significativa tra il coinvolgimento d'organo in pazienti con ANA+ e pazienti con fenomeno di Raynaud primitivo può essere attribuita al fatto che le indagini strumentali nel secondo gruppo sono state effettuate solo nei casi di pazienti sintomatici cosa che non è avvenuta nel caso di pazienti con ANA+ dove un numero maggiore di pazienti asintomatici sono stati sottoposti a ecocolordoppler cardiaco e TC del torace. Questo limite dell'indagine è legato al fatto che è stato voluto creare un protocollo che fosse vicino alla pratica clinica di tutti i giorni e che soddisfacesse le diverse possibilità dei centri partecipanti (hanno mostrato differenze proprio in merito agli strumenti disponibili).

Tali differenze sono evidenti quando si guarda l'esame degli autoanticorpi diversi relativi alla sclerosi sistemica: i tre autoanticorpi proposti in base all'indagine Delphi (ANA, anti-centromero e anti-topoisomerasi I autoanticorpi) sono stati esaminati nel 95,3-100% dei casi, mentre gli altri autoanticorpi nel 11% -71% dei casi. L'anticorpo anti-Th/To è stato testato in 13/33 centri (39,3%) ed è risultato negativo in tutti i casi, gli anti-RNA-polimerasi III autoanticorpi, che è noto essere correlato alla crisi renale sclerodermica, era disponibile per il test solo in 15/33 centri (45,4%).

Molto probabilmente anche la percentuale riscontrata nel progetto VEDOSS del coinvolgimento d'organo in fase preclinica sarebbe stata più elevata se tra le indagini di routine effettuata da tutti i centri fosse stata inclusa anche la manometria esofagea e anorettale, che ha mostrato invece nella nostra esperienza fornire dati significativi anche nei pazienti asintomatici.

Dati molto interessanti sono stati evidenziati proprio dalle indagini degli organi interni eseguiti al nostro centro di Firenze ed in particolare per quanto riguarda il coinvolgimento esofageo-anorettale e cardiaco. Purtroppo i dati su esofago-anoretto e cuore sono su una numerosità di pazienti diversi in quanto solo una porzione di pazienti ha accettato di essere sottoposto a manometria esofageo e anorettale, mentre i pazienti hanno accettato senza reticenze di eseguire ecocolordoppler cardiaco e RM cuore per cui la popolazione più numerosa è appunto quella dell'interessamento cardiaco. Inoltre per una valutazione più accurata dei dati ed estrapolazione dei risultati, nello studio sul cuore sono stati inclusi anche pazienti affetti da sclerosi sistemica conclamata così da avere sia una popolazione di controllo positivo, sia la possibilità di valutare la reale importanza di effettuare RM cardiaca nei pazienti con SSc, mentre nello studio sul coinvolgimento esofageo-anorettale i dati manometrici sono stati comparati con quelli di una popolazione di controllo di soggetti sani valutati per riferiti disturbi gastroenterici, in particolare 24 soggetti per la manometria esofagea (9 uomini e 15 donne) e 21 per quella anorettale (9 uomini e 12 donne). Questo esame strumentale infatti non è ancora entrato nella routine clinica per cui non esistevano ad oggi dati in proposito.

COINVOLGIMENTO ESOFAGEO-ANORETTALE:

Il coinvolgimento dell'apparato digerente in corso di SSc rappresenta sicuramente un importante e grave capitolo della malattia: possono essere coinvolte tutte le porzioni del tratto digerente ed i segmenti colpiti vanno incontro ad una progressiva

sostituzione della muscolatura liscia con tessuto fibrotico e conseguente perdita di funzione. L'esofago ed il tratto anorettale risultano le porzioni dell'apparato digerente maggiormente colpite, il loro coinvolgimento si aggira, secondo le diverse casistiche, tra il 50-90% ed il 50-70% rispettivamente (Sallam H et al., 2006).

La porzione dell'esofago maggiormente coinvolta risulta essere quella dotata di muscolatura liscia, con alterazione della peristalsi primaria ed ipotonia dello sfintere esofageo inferiore, che in alcuni pazienti può diventare anche del tutto incontinente (Lahcene et al., 2009). Nello studio di Roman et al. del 2010 è emersa una certa compromissione anche della porzione prossimale, le cui onde pressorie potrebbero alterarsi a seconda o meno di un coinvolgimento distale del viscere. Ancora poco chiara è la correlazione tra quadro anticorpale e coinvolgimento esofageo: molti studi ritengono la positività agli ACA protettiva nei confronti di un impegno viscerale esofageo, mentre trovano una certa associazione tra compromissione dell'esofago e positività agli anti-Scl70. Il coinvolgimento esofageo in corso di SSc non risulta essere sempre sintomatico, pertanto le manifestazioni cliniche non ci permettono di fare una diagnosi precoce delle complicanze della malattia a livello gastrointestinale (Ferri C et al., 2002; Mayes M D et al., 2003; Ioannidis J P et al., 2005; Catoggio LJ et al., 1983, Stacher G e coll., 2000).

Il segmento anorettale sembra essere la seconda porzione del tratto gastrointestinale più colpita dopo l'esofago ed un suo coinvolgimento ha un impatto diretto e grave nella qualità della vita del paziente. I soggetti possono lamentare diversi sintomi (diarrea, stipsi ed incontinenza fecale), tuttavia la correlazione tra sintomatologia ed alterazioni della motilità anorettale non sembra essere molto stretta, quindi l'assenza di sintomi non ci permette di escludere il coinvolgimento di questo tratto intestinale. Il canale anale sembra essere la porzione del tratto anorettale maggiormente colpita (Engel A.F., et al., 1994). Spesso si può rilevare un'alterazione della contrazione massima volontaria ed una diminuzione della *compliance* rettale (Whitehead WE et

al., 1989; Chiou AW et al., 1989). Entrambe queste due porzioni dell'apparato digerente sono studiate con l'esame manometrico che da molti viene considerato il gold standard per valutare i disturbi della motilità.

Dall'analisi dei dati ottenuti nella popolazione del centro di Firenze, emerge la presenza di un precoce impegno esofageo, con alterazioni a carico della peristalsi primaria e dello sfintere esofageo inferiore statisticamente significative rispetto alla popolazione di controllo.

La peristalsi è risultata essere assente nel 25,45% dei pazienti e si è mostrata alterata per quanto riguarda la sua pressione massima, media e la sua durata nei restanti soggetti in cui è stato possibile valutarla.

A carico dello sfintere esofageo inferiore è stato riscontrato una riduzione significativa sia della Pmax che della Pmed in accordo quindi con quanto emerge dalla letteratura.

Nel nostro studio sono stati riscontrati sintomi esofagi (disfagia e/o pirosi) nel 49,09% dei pazienti; è interessante notare che 12/14 pazienti senza peristalsi (85,7%) lamentavano sintomi imputabili ad un coinvolgimento esofageo. Tuttavia anche l'assenza di sintomi gastroesofagei è risultata significativamente correlabile all'alterazione della manometria esofagea, infatti la velocità della peristalsi sembra essere significativamente più bassa ($p=0,012$) nei pazienti senza sintomi rispetto a quelli con sintomi in cui invece si avvicina a quella dei controlli sani. Tali risultati confermano l'ipotesi che l'assenza di sintomatologia non esclude necessariamente il coinvolgimento esofageo e le manifestazioni cliniche non risultano predittive né di disordini pressori a carico del SEI, né di alterazioni peristaltiche del corpo esofageo.

Una parallela valutazione del coinvolgimento polmonare effettuata in 45/55 pazienti (81,82%) mediante HRTC torace, ha evidenziato la presenza di aree a vetro smerigliato, l'ispessimento dei setti intralobulari e interlobulari in 22/45 (48,89%) pazienti pur non risultando differenze statisticamente significative per quanto concerne i differenti parametri valutati alla manometria esofagea rispetto ai pazienti con TC negativa.

E' importante sottolineare come sia emerso un coinvolgimento esofageo anche nei pazienti senza alterazioni alle prove di funzionalità respiratoria, oltre che nei pazienti con DLCO<80%. Questo dato infatti permette di confermare la possibilità nonché la necessità di identificare 3 sottogruppi all'interno dei pazienti VEDOSS (FR, puffy fingers, ANA, ACA-antiSc170/alterazioni capillaroscopiche): 1. Pazienti senza coinvolgimento d'organo, 2, pazienti con coinvolgimento esofageo/anorettale, 3, pazienti con coinvolgimento GI e polmonare. Per tale motivo gli ultimi due gruppi dovrebbero rientrare nei pazienti in una fase precoce anziché molto precoce come recentemente proposto (Matucci-Cerinic M, 2012).

Nel nostro studio non sono emersi dati statisticamente significativi circa l'associazione tra il quadro autoanticorpale (ANA; ANA + ACA; ANA + antiSc170) e la manometria esofagea, questo elemento, sembrerebbe essere in disaccordo con quanto emerge in molti studi della letteratura da cui affiora una certa associazione tra la positività agli anti-Sc170 ed un coinvolgimento dell'esofago, da sottolineare, però, il fatto che in letteratura vengono presi in esame pazienti con SSc conclamata; mentre il nostro studio valuta soggetti in fase precoce/molto precoce di SSc.

Dall'analisi dei risultati del nostro studio si osserva anche un precoce interessamento del tratto anorettale. Disturbi a carico della pressione del canale anale ed alterazioni della contrazione massima, (sia della sua Pmax che della sua durata), sembrano essere le modificazioni più importanti a livello del tratto anorettale. In accordo con quanto riportato in letteratura (Sallam H., 2006; Ellen C, 2008; Herrick AL et al, 1996), il tono del canale anale, garantito essenzialmente dallo sfintere anale interno formato da fibre muscolari lisce, è risultato significativamente alterato rispetto alla popolazione di controllo sia per quanto riguarda la *pressione a riposo a 4, 3 e 2 cm dal margine anale* ($p=0,001$) che la Pmed del canale anale ($p=0,010$). Pertanto una sua alterazione sembra riflettere quel che succede a livello dell'esofago, con compromissione del tratto distale e dello sfintere inferiore (entrambi con muscolatura liscia). Inoltre a

livello anorettale si è rilevato anche una riduzione statisticamente significativa della contrazione volontaria massima (MVC) sia per quanto riguarda la Pmax ($p=0,017$), la Pmed ($p=0,005$), la durata ($p=0,001$) e la durata 50% ($p=0,003$). La contrazione massima volontaria è garantita, per la maggior parte, dallo sfintere anale esterno, una struttura a muscolatura striata; questo elemento pare suggerire che a livello del tratto anorettale si assiste anche ad una documentata compromissione della muscolatura striata, elemento che non sembra essere riscontrabile a carico dell'esofago, dove lo sfintere superiore, composto da fibre muscolari striate, non appare significativamente alterato nei nostri pazienti.

Dal nostro studio è emerso che così come per l'esofago anche per l'anoretto l'assenza di sintomatologia clinica non esclude un precoce coinvolgimento viscerale e non tutti i pazienti con alterazioni manometriche anorettali presentano una sintomatologia (solo 6 erano i pazienti sintomatici). Infatti mentre è emersa una correlazione tra la sintomatologia da impegno del tratto anorettale e la pressione massima e media del canale anale (rispettivamente $p=0,019$ e $p=0,039$) non si è osservata alcuna associazione statisticamente significativa tra la presenza di sintomi anorettali e la compromissione della contrazione massima volontaria. Pertanto la presenza di sintomi potrebbe essere predittiva o comunque associabile ad una compromissione del canale anale e dello sfintere interno, ma l'assenza di una sintomatologia non esclude certo la possibile presenza di un coinvolgimento anorettale, magari che riguarda la contrazione massima dello sfintere esterno.

COINVOLGIMENTO CARDIACO:

Nel centro di Firenze abbiamo inoltre approfondito il coinvolgimento cardiaco, altro importante aspetto della malattia sia per la prognosi infausta che lo caratterizza, sia per le difficoltà di gestione clinica. La prognosi dei pazienti affetti da SSc è fortemente condizionata dalla presenza o meno di interessamento cardiaco, infatti la mortalità a 5

anni è del 30% in questi pazienti. Inoltre il concomitante coinvolgimento di cuore, rene e polmone porta la mortalità a 5 anni all'80% (Ferri C. et al., 2002).

Le problematiche nella gestione clinica derivano dalla difficoltà nella diagnosi, in particolare nelle fasi precoci di malattia, dove il quadro clinico del paziente è dominato principalmente da sintomi di interessamento di altri organi ed apparati (vascolare, cutaneo, gastroenterico, polmonare) mentre sono solitamente assenti i sintomi cardiaci o, se presenti, sono aspecifici. Per questo motivo la diagnosi è spesso posta tardivamente, quando oramai si è già instaurato un danno cardiaco irreversibile. Una diagnosi precoce consentirebbe invece di attuare adeguate misure terapeutiche per fermare la progressione del danno e per la prevenzione delle complicanze e degli eventi fatali. La metodica di routine per indagare la presenza di coinvolgimento del cuore è l'ecocolordoppler cardiaco. Esso permette di valutare la funzione sistolica e diastolica biventricolare, la misurazione della PAP, volumi, diametrie, spessori, cinetica, presenza di versamento pericardico e valvulopatie, ma non è un mezzo diagnostico accurato e sensibile per la ricerca della presenza di fibrosi cardiaca. La RMC con DE del gadolinio è considerata il *gold standard* non invasivo per lo studio della fibrosi miocardica, mentre la RMC con sequenze T2-pesate ci consente di identificare l'edema miocardico.

Nel nostro studio, considerando il gruppo totale di pazienti (Very Early SSc, Early SSc, SSc), la fibrosi miocardica, dimostrata con DE del gadolinio, si riscontra in una percentuale alta di pazienti (27%).

Gli studi precedenti su RMC nei pazienti con SSc conclamata hanno mostrato una prevalenza di DE che variava dal 21% (Hachulla A.L. et al., 2009) al 66% (Tzelepis GE et al., 2007); nel nostro lavoro, nel gruppo di pazienti SSc, questa percentuale è stata del 32,5%.

Questo studio è stato il primo ad aver valutato la presenza di alterazioni cardiache alla RMC negli stadi precoci di malattia. E' interessante notare che di 44 pazienti con

diagnosi di Very Early SSc, ben 7 (15,9%) presentavano fibrosi miocardica nonostante la fase precocissima di malattia, a dimostrare che il coinvolgimento del cuore, anche se in maniera del tutto asintomatica può essere presente fin dalle prime fasi di malattia. Risultati simili si ottengono nei pazienti con diagnosi di Early SSc nei quali abbiamo riscontrato la fibrosi miocardica nel 30,7 % dei casi. Sarebbe interessante poter valutare la progressione della fibrosi in questi soggetti, sottoponendoli a RMC a distanza di tempo o in caso di insorgenza di sintomatologia cardiaca, in modo da valutare la diversa evoluzione dei pazienti con o senza fibrosi cardiaca e poter attribuire un valore prognostico a questo parametro. Un altro dato rilevante è aver riscontrato la presenza di edema miocardico in 3 pazienti con diagnosi di Very Early SSc, Early SSc e SSc, che, sarebbe rimasta misconosciuta dal momento che i pazienti erano asintomatici e l'ecocardiogramma risultava normale, così come gli indici di flogosi e l'NT-proBNP. Non possiamo sapere se queste miocarditi si sarebbero risolte spontaneamente o se avrebbero dato segno di sé manifestandosi a livello clinico, essendo state prontamente trattate con terapia steroidea con risoluzione del quadro alle immagini di RMC.

Il nostro studio prevedeva nella stessa giornata, l'esecuzione di RMC ed ecocolordoppler cardiaco. E' interessante notare che la presenza di fibrosi miocardica alla RMC non è correlata ad alcun dato ecocardiografico. Abbiamo soltanto evidenziato una ridotta frazione d'eiezione (FE) e ridotti valori di TAPSE, che rimangono però sempre nell'ambito della normalità. La leggera riduzione della FE nei pazienti con DE sembra indicare un'iniziale, seppur minima, compromissione della funzione sistolica del ventricolo sinistro, mentre la riduzione del TAPSE suggerisce un'iniziale alterazione della funzione sistolica del ventricolo destro. Per quanto concerne le correlazioni con la storia clinica dei pazienti, è emersa un'associazione tra la storia di ulcere digitali e la presenza di DE alla RMC ($p=0,021$). E' da notare che la presenza di un importante coinvolgimento vascolare periferico, tale da manifestarsi con ulcerazioni digitali, possa

essere un fattore di rischio capace di predire la fibrosi miocardica. E' conosciuto, infatti, come il FR e la sua gravità, così come la presenza di ulcere attive, siano un indice di attività di malattia. Abbiamo valutato l'eventuale correlazione fra la presenza di DE con i dati delle prove di funzionalità respiratoria, rilevando che i pazienti con fibrosi cardiaca avevano valori della DLCO significativamente inferiori rispetto ai pazienti che non presentavano DE. L'interessamento polmonare sembra quindi un fattore prognostico negativo anche per lo sviluppo di fibrosi cardiaca. Questi dati nel complesso sembrano suggerire che l'interessamento vascolare e polmonare vadano di pari passo con il coinvolgimento cardiaco.

9. CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati preliminari del progetto VEDOSS, i criteri diagnostici precoci proposti da EUSTAR, sono in grado di identificare un sottoinsieme di pazienti, dal quale pazienti con sclerosi sistemica molto precoce probabilmente saranno diagnosticati, grazie alla sempre maggiore attenzione posta nei confronti delle "red flags". Queste ultime infatti consentono di porre il sospetto di malattia che come abbiamo visto spesso risulta confermato. Nei pazienti con SSc molto precoce risulta opportuno indagare circa un possibile precoce interessamento preclinico viscerale. Il coinvolgimento dell'apparato digerente si ha nella maggior parte dei soggetti con SSc in fase precoce. Tale coinvolgimento deve sempre essere ricercato, data sia la sua elevata prevalenza (che arriva fino al 90% per l'esofago) sia perché è causa di aumento di morbilità e di mortalità (circa 10% dei casi). La letteratura esistente circa il coinvolgimento dell'apparato digerente in corso di malattia ha finora preso in esame pazienti con SSc conclamata, la vera innovazione del nostro studio è il fatto di esaminare pazienti in fase molto precoce di malattia, senza apparente coinvolgimento degli organi interni e senza coinvolgimento cutaneo di malattia. Studiare tale range di

pazienti ci permetterà di trattare i soggetti in fasi sempre più precoci e quindi cercare di evitare il danno d'organo irreversibile. Inoltre potrà essere utile dal punto di vista patogenetico, in quanto ci permetterà di evidenziare il progredire della malattia dal coinvolgimento microvascolare agli organi interni e quindi alla fibrosi.

Il nostro studio condotto su una popolazione di 59 pazienti “very early SSc” ha posto in evidenza un reale coinvolgimento precoce dell’esofago, spesso asintomatico, ed un altrettanto frequente e prematuro impegno del tratto anorettale. Questi pazienti in fase very early di SSc presentano un’alterazione sia della peristalsi che degli sfinteri esofagei. Inoltre sono pazienti che possiedono soltanto un coinvolgimento di malattia a livello microvascolare (fenomeno di Raynaud, videocapillaroscopia, autoanticorpi). Potremmo quindi ipotizzare che esista una correlazione tra alterazioni a livello vasale e del sistema nervoso periferico che innerva i tratti gastroenterici. Tale teoria deve essere ancora approfondita e sviluppata, ma è ormai riconosciuto il link esistente tra vasi e nervi e come questi due sistemi complessi progrediscono insieme nella filogenesi degli organi. Infatti la morfogenesi del sistema nervoso e sanguigno suggerisce che entrambi si sviluppano mediante meccanismi geneticamente programmati (figura 9.1). Ci sono sempre più evidenze che i vasi sanguigni (generatesi evolutivamente dopo i nervi) si sviluppano mediante gli stessi meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso (Mukouyama Y.S. et al.,2002).

Figura 9.1: Parallelismo strutturale tra sistema nervoso (a sinistra) e sistema vascolare (tavola a destra).

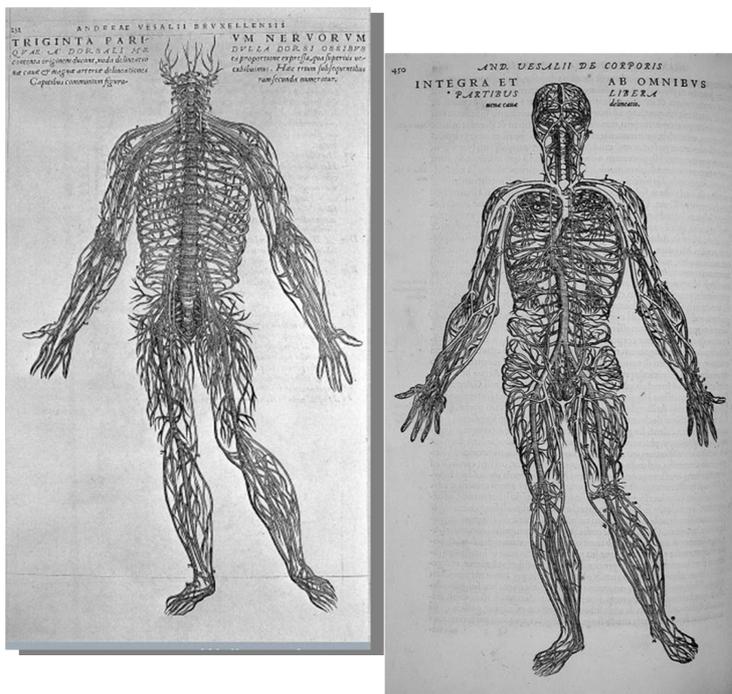


Illustrazione di Andrea Vesalio (1514-1564) da “De fabrica humani corporis

In questo modo viene evidenziata l'importanza di sottoporre i pazienti "molto precoci" ad un'analisi "di screening" per indagare circa lo stato di questi due segmenti gastrointestinali. Per quanto riguarda il coinvolgimento cardiaco invece dal nostro studio è emerso che, se valutato tramite la presenza di fibrosi miocardica alla RMC, è presente in una percentuale relativamente alta di pazienti e fin dalle prime fasi di malattia. La presenza di fibrosi miocardica, infatti, è stata riscontrata anche nella popolazione di pazienti Very Early SSc, appartenenti al progetto europeo VEDOSS, nonostante i dati finora disponibili indicassero un coinvolgimento di malattia, esclusivamente a livello microvascolare (FR e videocapillaroscopia). Un altro elemento di rilievo è stato il riscontro di edema miocardico alla RMC in pazienti del tutto asintomatici e con ecocardiogramma normale, indici di flogosi negativi e NT-proBNP nella norma. I nostri dati, confermano quindi l'utilità della RMC nella SSc, per individuare i pazienti con coinvolgimento cardiaco latente, sia reversibile, come l'edema miocardico, sia irreversibile, come la fibrosi miocardica. Rimane comunque da stabilire il significato prognostico di questi dati. Studi multicentrici con popolazioni ancora più numerose e con lungo follow-up saranno necessari per comprendere il significato clinico di questi dati preliminari e definire se un intervento terapeutico precoce in questo senso possa garantire una maggiore sopravvivenza ed un miglioramento della qualità di vita dei nostri pazienti.

Per concludere possiamo quindi evidenziare come da questo studio, che continuerà nel tempo arruolando un numero sempre più vasto di pazienti non soltanto a livello italiano ma anche a livello europeo, si possa suddividere la popolazione affetta da sclerosi sistemica in tre fasi: una di very early, una seconda di early ed una terza di sclerosi sistemica stabilizzata. Fino ad oggi non eravamo a conoscenza né della reale incidenza del coinvolgimento gastroenterico della popolazione ssc né tantomeno quanto precocemente fosse coinvolto il cuore. Dopo tale studio siamo a conoscenza

che il cuore può subire una fibrosi e/o edema già nelle primissime fasi di malattia e che il sistema GI è coinvolto sempre già nelle primissime fasi di malattia. Inoltre è emerso quanto sia importante eseguire RM cuore nella popolazione di pazienti affetti da SSc sin dalle prime fasi di malattia.

Queste evidenze portano ad un cambio epocale nel considerare la terapia di pazienti affetti da ssc. Fino ad oggi si cercava di bloccare il sistema immunitario quando i segni di fibrosi a livello polmonare avevano già lasciato i segni, oggi si inizia invece a pensare di utilizzare una terapia nella fase precoce di malattia e soprattutto usare una terapia di tipo vascolare che possa dilazionare nel tempo il danno microvascolare così che il fenomeno di Raynaud visibile a livello della mani dei nostri pazienti, non lasci danni anche agli organi interni. In tal senso farmaci nuovi come possono essere gli antirecettori dell'endotelina o gli anti PDE5 saranno farmaci che verranno sempre più utilizzati nelle fasi precoci di malattia.

BIBLIOGRAFIA

- Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R and Metz CN, 2001, "Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites", *J Immunol* 166; 7556-7562.
- Allanore Y, Meune C, Kahan A. Outcome measures for heart involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47 (Suppl 5):v51-v53
- Allanore Y, Meune C, Vignaux O, et al. Bosentan increases myocardial perfusion and function in systemic sclerosis: a magnetic resonance imaging and Tissue-Doppler echography study. *J Rheumatol* 2006;33:2464—9
- Altman RD, Medsger TA, Bloch DA et al. "Predictors of survival in systemic sclerosis (scleroderma)", *Arthritis Rheum* 1991; 34: 403-13.
- Andersen GN et al. "Correlation between increased nitric oxide production and markers of endothelial activation in systemic sclerosis", *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1085-93.
- Ansell et al. "Scleroderma in childhood", *Clin Dermatol* 1994; 12: 299-307
- Arnson Y, Amital H, Guiducci S, Matucci Cerinic M, Valentini G, Barzilai O, Maya R, Shoenfeld Y – *Ann N Y Acad Sci* 2009 Sept; 1173: 627-32.
- Artlet CM et al., "Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis." *N Engl J Med* 1998;338:1186-91.
- Aryal BK, Khuder SA, Schaub EA "Meta-analysis of systemic sclerosis and exposure to solvents", *Am J Ind Med* 2001; 40: 271-4.
- Assassi S, Del Junco D, Sutter K, et al. Clinical and genetic factors predictive of mortality in early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2009; 61:1403-1411

- Avouac J, Franssen J, Walker UA et al. Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis (VEDOSS): results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis* 2010;69(Suppl. 3):128
- Beatty PG "National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) workshop on the importance of minor histocompatibility antigens in marrow transplantation" September 16-17 1996; Bethesda; Maryland *Exp Hematol* 25: 548-558; 1997
- Bellando Randone S, Guiducci S, Matucci Cerinic M "Patients subgroups and potential risk factors in SSc; is there a possibility of an early diagnosis?", *Int J Clin Rheumatol* 2010; 5 (5): 555-564.
- Belotti Masserini A, Zeni S, Cossutta R, Soldi A, Fantini F, "Costo of illness in systemic sclerosis: a retrospective study of an Italian cohort of 106 patients", *Reumatismo* 2003; 55 (4):245-255.
- Bezante GP, Rollando D, Sessarego M, et al. Cardiac magnetic resonance imaging detects subclinical right ventricular impairment in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2007; 34:2431-2437
- Bianchi DW et al., "Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum", *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 705-708; 1996.
- Black CM Du Bois RM, "Organ involvement pulmonary" Clements PJ Furst DE eds. *systemic sclerosis*; Baltimore: Williams and Wilkins 1996; p. 299: 193-209.
- Black CM, et al. Measurement of skin involvement in scleroderma. *J Rheumatol* 1995;22:1217-9
- Boast S, et al. Functional analysis of cis-acting DNA sequences controlling transcription of the human type I collagen genes. *J Biol Chem*. 1990

- Bordron A et al., "The binding of some antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis", *J Clin Invest* 1998; 101: 2029-35.
- Bradiey DS et al., "Chronic graft versus host disease-associated autoimmune manifestations are independently regulated by different MHC class II loci", *J Immunol* 152:1960-69; 1994.
- Bulkley BH, Ridolfi RL, Salyer WR, et al. Myocardial lesions of progressive systemic sclerosis. A cause of cardiac dysfunction. *Circulation* 1976;53:483—90
- Cagnoni M et al. "La SSc e le "sindromi correlate""- Relazione al 95° Congresso della Società Italiana di Medicina Interna, 1994 Ott 18-21, Firenze. Ed Luigi Pozzi, Roma, 1995: 1-133.
- Campbell PM and Le Roy EC "Pathogenesis of systemic sclerosis: avascular hypothesis", *Semin Arthritis Rheum*, 1975: 4:351-68
- Cannon PJ et al., "The relationship of hypertension and renal failure in scleroderma to structural and functional abnormalities of renal cortical circulation", *Medicine* 53: 1-46, 1974.
- Carvalho D et al. "IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce adhesion to human vascular endothelial cells in vitro", *J Clin Invest* 1996; 97: 111-119.
- Casciola-Rosen L et al. "Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalized oxidation reactions: implications for pathogenesis", *J Exp Med* 1997; 185: 71-9.
- Catoggio LJ, Bernstein RM, Black CM, Hughes GR, Maddison PJ, "Serological markers in progressive systemic sclerosis: clinical correlations", *Ann Rheum Dis* 1983; 42: 23-7.

- Cavallo G et al. "Nitric oxide synthesis in peripheral blood monuclear and polymorphonuclear cells from patients with systemic sclerosis", *Rheumatology* 1999; 38: 1301-4
- Champion HC. The heart in scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 2008; 34:181-190
- Chiffлот H, Fautrel B, Sordet C, Chateleu E, Sibia J, "Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systemic literature review", *Semin Arthritis Rheum* 2008 Feb; 37(4): 223-235.
- Chiou A W-H, Lin J-K et al. "Anorectal abnormalities in progressive systemic sclerosis", *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 417-421.
- Claman HN "Graft-versus-host disease and animal model for scleroderma", *Curr Opin Rheumatol* 2: 929-931; 1990.
- Clements PJ, Becvar R, Drosos AA, Ghattas L, Gabrielli A, "Assessment of gastrointestinal involvement", *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21 (3 Suppl. 29): S15-8.
- Clements PJ, et al. Inter- and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1995;22:1281-5
- Clements PJ et al. Muscle disease in progressive systemic sclerosis: diagnostic and therapeutic consideration. *Arthritis Rheum* 21:62-71, 1978
- Cleveland MG et al, "Enhanced interferon-alfa/beta and defective INF-alfa-beta production in chronic graft versus host disease: a potential mechanism for immunosuppression", *Cell Immunol* 1987; 110: 120-130;.
- Condliffe R, Kiely DG, Peacock AJ, et al. Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension in the modern treatment era. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:151—7

- Cortesini C., Cianchi F., Pucciani F.: Long-term results of Heller myotomy without an antireflux procedure in achalasic patients. *Chir. Ital.* 2002; 54: 581-586
- Cotton SA et al. "Endothelial expression of nitric oxide synthase and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin", *J Pathol* 1999; 189: 273-8
- Cozzi F, Zucchetta P, Durigon N, Marzola MC, Bullo A, Favaro M, Bui F, Todesco S, "Alterazioni della peristalsi esofagea nelle diverse forme cliniche e specificità anticorpali della sclerodermia: studio scintigrafico in 100 pazienti"; *Reumatismo* 2003; 55(2): 86-92.
- Cutolo M, Grassi W, Matucci-Cerinic M. Raynaud's phenomenon and the role of capillaroscopy. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3023-30
- Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C et al., "Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in Systemic sclerosis", *The Journal of Rheumatology*, 2000; 27: 155-160.
- Cutolo M, Pizzorni C & Sulli A. Identification of transition from primary Raynaud's phenomenon to secondary Raynaud's phenomenon by nailfold videocapillaroscopy: comment on the article by Hirschl, et al. *Arthritis and Rheumatism* 2007; 56: 2102–2103.
- D'Andrea A, Stisi S, Bellissimo S, et al. Early impairment of myocardial function in systemic sclerosis: non-invasive assessment by Doppler myocardial and strain rate imaging. *Eur J Echocardiogr* 2005;6:407—18
- D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE, "Pathologic observation in systemic sclerosis (scleroderma)", *Am J Med* 1969; 46: 428-40.
- Davies CA, Jeziorska M, Freemont AJ, Herrick AL, "The differential expression of VEGF, VEGFR-2 and GLUT-1 proteins in disease subtypes of systemic sclerosis", *Hum Pathol.* 2006; 37: 190-7.

- Davis K et al., "Circulating Fcγ receptor specific autoantibodies in localized and systemic sclerosis", *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 612-6.
- de Groote P, Gressin V, Hachulla E, et al. Evaluation of cardiac abnormalities by Doppler echocardiography in a large nationwide multicentric cohort of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:31—6
- deSouza NM, Williams AD, Wilson HJ, Gilderdale DJ, Coutts GA, Black CM. Fecal incontinence in scleroderma: assessment of the anal sphincter with thin-section endoanal MR imaging. *Radiology*. 1998 Aug;208(2):529-35
- Distler O et al., "Vasculopathy in the pathogenesis of systemic sclerosis", Oral presentation, 1^o systemic sclerosis world congress, 11 feb 2010
- Distler O, Distler JH, Scheid A et al., "Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis", *Circ Res* 2004; 95: 109-16.
- Domsic R, Fasanella K, Bielefeldt K, "Gastrointestinal manifestations of systemic sclerosis", *Dig Dis Sci*, 2008; 53: 1163-74.
- El-Shafie MM, Salem SS, Moghazi AA. Left ventricular myocardial ischemia in collagen disease associated with pulmonary hypertension: an evaluation by rest-stress gated SPECT and coronary angiography. *Nucl Med Commun* 2011; 32:641-648
- Ellen C, Ebert, MD, "Gastric and enteric involvement in progressive systemic sclerosis", *J Clin Gastroenterol*, vol. 42, n.1, 2008.
- Emerit et al. "Clastogenic activity in the plasma of scleroderma patients: a biomarker of oxidative stress", *Dermatology* 1997; 194: 140-6.
- Engel AF, Kamm MA, Talbot IC, "Progressive systemic sclerosis of internal anal sphincter leading to passive faecal incontinence", *Gut* 1994; 35: 857-859

- Englert H, Joyner J, Bade R, "Systemic scleroderma: a spatiotemporal clustering", *Int Med J* 2005; 35: 228-33.
- Falanga V. "Localised scleroderma", *Med Clin N Am* 1989; 73: 1143-56.
- Ferrarini M et al., "Functional and phenotypic analysis of T lymphocytes cloned from the skin of patients with systemic sclerosis", *Clin Exp Immunol* 79: 346-352, 1990.
- Ferri C, Valentini G, Cozzi F et al., "Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1.012 Italian patients", *Medicine* 2002; 81: 139-53.
- Ferri C, Emdin M, Nielsen H, et al. Assessment of heart involvement. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S24—8
- Fine GL, Denton CP, Black CM, Korn JH, de Crombrughe B. Systemic sclerosis: current pathogenetic concepts and future prospects for targeted therapy. *Lancet* 1996; 347: 1453-8
- Flavahan NA, Flavahan S, Mitra S and Chotani MA, "The vasculopathy of Raynaud's phenomenon and scleroderma", *Rheum Dis Clin North Am*, 2003
- Fleischmaier R et al., "Immunofluorescence analysis of collagen, fibronectin and basement membrane protein in scleroderma skin", *J Invest Dermatol* 112: 1553-57; 1976.
- Forbes A, Matie I, "Gastrointestinal complications: the most frequent internal complications of systemic sclerosis", *Rheumatol* 2009; Suppl 3: iii36-9.
- Generini S, Fiori G, Moggi Pignone A et al. "Systemic sclerosis. A clinical overview", *Adv Exp Med Biol* 1999; 455: 73-83.
- Gharaee-Kermani M et al., Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor β -1 gene expression by monocyte

chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996; 271: 17779-84.

- Giacomelli R, Valentini G, Salsano F, Cipriani P, Sambo P, Conforti ML et al., "Cyclophosphamide pulse regimen for the treatment of alveolitis in systemic sclerosis", *J Rheumatol* 2002; 29: 731-6.
- Giacomelli R et al., "Circulating V α 1 +T cells are activated and migrate in the skin of systemic sclerosis patients", *Arthritis Rheum* 1998; 41: 327-33
- Giordano M, Valentini G, Vatti M. Systemic sclerosis sine scleroderma and correlated diagnostic problems. *Conn Tiss Dis* 1982; 1: 115-36
- Gonzalez R, Storr M, Bloching H, Seige M, Ott R, Allescher HD, "Autoantibody profile in progressive systemic sclerosis as markers for esophageal involvement", *J Clin Gastroenterol* 2001; 32: 123-7.
- Graninger GH et al., "Derangement of apoptosis related lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis", *Rheumatology* 2000; 39: 1341-50.
- Gruschwitz K. et al, "Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity". *Arthritis Rheum.* 1995;38:184-9
- Gustaffson GT et al. Eosinophil activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1991;34:414-9.
- Hachulla AL, Launay D, Gaxotte V, et al. Cardiac magnetic resonance imaging in systemic sclerosis: a cross-sectional observational study of 52 patients. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:1878-1884
- Hasegawa M et al. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein 1 –MCP1- macrophage inflammatory protein 1 –MIP1- α e β) in patients with systemic sclerosis: MCP1 e MIP-1 α may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:159-65.

- Henry PA et al. "Diversity and plasticity of the anti-DNA topoisomerase I autoantibodies response in scleroderma", *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2733-42.
- Herrick AL, Worthington A, "Genetic epidemiology: systemic sclerosis", *Arthritis Res* 2002; 4: 165-168.
- Herrick AL, Barlow JD, Bowden A et al. "Investigation of anal function in patients with systemic sclerosis", *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 370-374.
- Herzenberg LA et al., "Fetal cells in the blood of pregnant women. Detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting", *Proc nati Acad Sci USA* 76: 1453-1455; 1979.
- Housset E et al. "Anomalies chromosomiques dans la sclerodermie generalisée, Etude de dix malades", *CR Acad Sci (paris)* 1969; 269:413-19
- Hudson M, Fritzler MJ, Baron M. "Systemic sclerosis: establishing diagnostic criteria". *Medicine (Baltimore)* 2010;89:159-65
- Hutchinson DL et al., Persistence of donor cells in neonates after fetal and exchange transfusion. *Am J Obstet Gynecol* 109:281-284, 1971
- Iles L, Pfluger H, Phrommintikul A, et al. Evaluation of diffuse myocardial fibrosis in heart failure with cardiac magnetic resonance contrast-enhanced T1 mapping. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:1574-1580
- Ioannidis JP, Vlachoyiannopoulos PG, Haidich AB et al., "Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data", *Am J Med* 2005; 118: 2-10.
- Jaffe BD "Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma", Description of model systems, *Cell Immunol* 77; 1-12; 1983.
- Jaffin BW, Chang P, Spiera H Fecal incontinence in scleroderma. Clinical features, anorectal manometric findings, and their therapeutic implications. *J Clin Gastroenterol.* 1997 Oct;25(3):513-7

- James TN. De subitaneis mortibus. VIII. Coronary arteries and conduction system in scleroderma heart disease. *Circulation* 1974;50:844—56
- Jelaska A and Korn J, “Role of apoptosis and transforming growth-factor B1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis”, *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2230-9.
- Jimenez SA et al. Animal models of systemic sclerosis, in Clements PJ, Furst DE (eds): *Systemic Sclerosis*. Baltimore, MD, Williams Sr Wilkins, 1996, pp 251-273
- Johnson RW, Tew MB, Arnet FC, “The genetics of systemic sclerosis”, *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4: 99-107.
- Johnson KL et al., Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2001;44:1848-54.
- Kahaleh BM et al., “ Study of endothelial dependent relaxation in scleroderma”, *Arthritis Rheum* 1993; 36 (suppl): b233.
- Kahaleh BM et al. Endothelial injury and its implications. In: Neri Serneri GG, Gensini GF, Abbate R, Prisco D (eds). *Thrombosis: an update*, Scientific Press, Florence, 1992; pag 649-61
- Kahaleh BM. Lymphocyte interactions with the vascular endothelium in scleroderma. *Clin Dermatol* 12:253-60, 1994
- Kahaleh BM et al., Increased factor VIII/von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor activity in scleroderma and Raynaud’s phenomenon. *Ann Intern Med*. 1981;94:482-4
- Kahaleh BM, “The role of vascular endothelium in fibroblast activation and tissue fibrosis, particularly in scleroderma (systemic sclerosis) and pachydermoperiostosis (primary hypertrophic osteoarthropathy)”, *Clin Exp Rheum* 1992; 10:51.

- Kahaleh BM et al. Elevated levels of circulating platelet aggregates and alpha-tromboglobulin in scleroderma. *Ann Intern Med.* 1982;96:610-13
- Kahaleh BM "Endothelin : an endothelial dependent vasoconstrictor in scleroderma", *Arthritis Rheum* 1991; 34:978-83.
- Kahan A, Coghlan G, McLaughlin V. Cardiac complications of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48 (Suppl 3):iii45-iii48
- Kahan A, Allanore Y. Primary myocardial involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45(Suppl. 4), iv14-7
- Kikuchi K et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997; 108:281-4.
- Kikuchi K. et al. Serum tissue inhibitor of metalloproteinase in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33:973-9.
- Kikuchii K. et al. Impaired growth response to endothelin-1 in scleroderma fibroblasts. *Biochem Biophys res Commun* 1995; 207: 829.
- Kobayashi H, Yokoe I, Hirano M, et al. Cardiac magnetic resonance imaging with pharmacological stress perfusion and delayed enhancement in asymptomatic patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2009; 36:106-112
- Lahecene M, Oumnia N, Matougui N, Boudjella M, Tebaibia A, Touchene B, "Esophageal dysmotility in scleroderma: a prospective study of 183 cases", *Gastroentérologie Clinique et Biologique* (2009); 33: 466- 469
- Lapenas D et al. "Immunopathology of the renal vascular lesion of the progressive systemic sclerosis (scleroderma)", *Amer J Pathol* 91:243-258, 1978.

- Lau CS et al., "Further evidence of increased polymorphonuclear cell activity in patients with Raynaud's phenomenon", Br J Rheumatol 1992; 31: 375-80.
- LeRoy EC, "Systemic sclerosis: a vascular perspective", Rheum Dis Clin North Am 1996; 22: 675-94.
- LeRoy EC and Medsger TA Jr "Raynaud phenomenon: a proposal for classification", Clin Exp Rheumatol 1992; 10:485-488.
- LeRoy EC, Medseger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. J Rheum 2001; 28(7) :1573-1576
- LeRoy EC "A brief overview of pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis)"; Ann Rheum Dis 1992; 51: 286-288.
- LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R et al. "Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis", J Rheumatol 1988; 15: 202-5.
- Lo YM et al., Two-way cell traffic between mother and fetus: Biologic and clinical implications. Blood 88:4390-4395, 1996
- Lonzetti LS, Joyal F, Raynaukd JP, et al. Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. Arthritis Rheum 2001 44 (3); 735-36
- Luggen M, Belhorn L, Evans T, Fitzgerald O, Spencer-Green G. The evolution of Raynaud's phenomenon: a longterm prospective study. J Rheumatol 1995;22:2226-32
- Lunardi C et al., "Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bond the human cytomegalovirus late protein UL94 and induced apoptosis in human endothelial cells", Nature Med 2000; 6: 1183-6.
- Mackel et al: Antibody to collagen in scleroderma. Arthritis Rheum. 1982;25 :522-31

- Maione S, Cuomo G, Giunta A, et al. Echocardiographic alterations in systemic sclerosis: a longitudinal study. *Semin Arthritis Rheum* 2005;34:721—7
- Mann RA et al., “The host response in graft versus host disease. III. The in vitro induction of regulatory cells in chronic murine graft versus host disease”. *Cell Immunol* 164:1-10, 1995.
- Manno RL, Wigley FM, Gelber AC, Hummers LK. Late-age onset systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2011; 38:1317-1325
- Mark M et al., “The effect of scleroderma serum on human vascular endothelial cells: introduction of antibody dependent cellular cytotoxicity”, *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1524-34.
- Maricq HR, “Comparison of quantitative and semiquantitative estimates of nailfold capillary abnormalities in scleroderma spectrum disorders” *Microvasc Res* 32:271-276,1986.
- Maricq HR, LeRoy EC. Patterns of finger capillarity abnormalities in connective tissue disease by “wide field”microscopy”. *Arthritis Rheum* 1973;16:619-628.
- Maricq HR, LeRoy EC, D’Angelo WA, Medsger TA, Rodnan GP, Sharp GC, et al. Diagnostic potential of in vivo capillary microscopy in scleroderma and related disorders. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 183-9
- Marie I, Ducrotte P, Denis P, Hellot MF, Levesque H, “Oesophageal mucosal involvement in patients with systemic sclerosis receiving proton pump inhibitor therapy”, *Alimentary pharmacology & Therapeutics* 2006; 1593-1601.
- Martelli H, Devroede G et al, “Some parameters of a large bowel motility in normal man”, *Gastroenterol* 75: 612-8; 1978.

- Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA Jr et al. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23(5):581-90
- Matucci-Cerinic M, Allanore Y, Czirják L, et al. The challenge of early systemic sclerosis for the EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) community. It is time to cut the Gordian knot and develop a prevention or rescue strategy. *Ann Rheum Dis*. 2009 Sep; 68:1377-80
- 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* 2012 (in press)
- Matucci Cernic M et al. "From Raynaud phenomenon to systemic sclerosis (scleroderma): lack or exhaustion of adaption", *Ad Organ Biol* 1998; 6: 241-53.
- Mayes MD "Scleroderma epidemiology", *Rheum Dis Clin North Am* 2003 May; 29 (2): 239-254.
- Mayes MD, lacey JV, Beebe-Dimmer J et al. "Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population", *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2246-55.
- McMilin KD et al., "HLA homozygosity and the risk of related-donor transfusion-associated graft-versus-host disease", *Transfus Med Rev* 7: 37-41, 1993.
- Meier FM, Frommer KW, Dinser R, Walker UA, Czirjak L, Denton CP, Allanore Y, Distler O, Riemekasten G, Valentini G, Muller-Ladner U. Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1355-60

- Merkel PA, Herylin K, Martin RW, Anderson JJ, “Measuring disease activity and functional status in patient with scleroderma and Raynaud’s phenomenon”, *Arthritis Rheum* 2002; 4 (9): 2410-2420.
- Messroghli DR, Greiser A, Frohlich M, et al. Optimization and validation of a fully-integrated pulse sequence for modified look-locker inversion-recovery (MOLLI) T1 mapping of the heart. *J Magn Reson Imaging* 2007; 26:1081-1086
- Meune C, Allanore Y, Pascal O, et al. Myocardial contractility is early affected in systemic sclerosis: a tissue Doppler echocardiography study. *Eur J Echocardiogr* 2005;6:351—7
- Meune C, Avouac J, Wahbi K, et al. Cardiac involvement in systemic sclerosis assessed by tissue-Doppler echocardiography during routine care: a controlled study of 100 consecutive patients. *Arthritis Rheum* 2008; 58:1803-1809
- Meune C, Vignaux O, Kahan A, et al. Heart involvement in systemic sclerosis: evolving concept and diagnostic methodologies. *Arch Cardiovasc Dis* 2010; 103:46-52
- Meyer O. Prognostic markers for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2006;73:490-4.
- Mukouyama Y. S., Shin D., Britsch S., Taniguchi M. and Anderson D. J. (2002). Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 109, 693—705.
- Murrel DF “A radical proposal for the pathogenesis of scleroderma”, *J Am Acad Dermatol* 1993; 28:78-85.
- Needieman BW et al., “ Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma”, *Arthritis Rheum* 35: 67-72; 1992.

- Nelson JL, “Maternal fetal immunology and autoimmune disease: is some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmun?” *Arthritis Rheum* 1996;39:191-4.
- Nelson JL et al, “Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in women with scleroderma” *Arthritis Rheum* 40:199, 1997 (suppl)
- Peng SL et al. “Scleroderma: a disease related to damaged proteins?”, *Nature Med* 1997; 3: 276-8.
- Perera A, Fertig N, Lucas M, et al. Clinical subsets, skin thickness progression rate, and serum antibody levels in systemic sclerosis patients with anti-topoisomerase I antibody. *Arthritis Rheum* 2007;56:2740—6
- Poelmans J, Tack J 2005 “Extraesophageal manifestations of gastro-oesophageal reflux”, *Gut* 54: 1492-1499.
- Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, Medsger TA Jr. Systemic sclerosis sine scleroderma. Demographic, clinical, and serological features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum* 2000; 2: 444-51
- Postlethwaite AE “Early immune events in scleroderma”, *Rheum Dis Arch N Am* 1990; 16: 125-39.
- Pucciani F., Rottoli M.L., Bologna A., Buri M., Cianchi F., Pagliai P., Cortesini C.: Anterior rectocele and anorectal dysfunction. *Int. J. Colorectal Dis.* 1996; 11: 1-9
- Reilly IAG et al. “ Biosynthesis of thromboxane in patients with systemic sclerosis and Raynaud’s phenomenon”, *br Med J*, 1986; 292: 1037-9-
- Roberts A et al., Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:4167-71.

- Rodnan GP et al. "Morphologic change in the digital arteries of patient with progressive systemic sclerosis (scleroderma) and Raynaud' phenomenon" *Medicine* 59:393-408,1980.
- Roman S., Hot A., Fabien N., Cordier J-F, Miossec P, Ninet J, Mion F, "Esophageal dysmotility associated with systemic sclerosis: a high-resolution manometry study", *Disease of the esophagus* 2010.
- Roumm et al., "Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis", *Arthritis Rheum* 1984; 27: 645-53.
- Sacu O , Fiori G, Bartoli F, Braschi F, Amanzi L, Denaro V, et al. Calcinosis in systemic sclerosis: identification of 4 different subtypes. 1° systemic sclerosis world congress 2010
- Sallam H, Mcnearney TA, Chen JDZ "Systematic review: pathophysiology and management of gastrointestinal dysmotility in systemic sclerosis (scleroderma)", *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23:691-712-
- Sambo P et al. "Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma) spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion", *J Invest Dermatol* 1999; 112: 78-84.
- Santiago B et al. "Decreased susceptibility to Fas-Induced Apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblast", *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1667-76.
- Sapadin AN et al, Immunopathogenesis of scleroderma. Evolving concepts. *Mount Sinai J Med* 2001; 68:233-42
- Savas N, Dagli U, Ertugrul E et al. "Autoantibody profile in sistemi sclerosis as a marker for esophageal and other organ involvement in Turkish populations", *Dig Dis Sci*, 2007; 52: 3081-3086
- Schelbert EB, Testa SM, Meier CG, et al. Myocardial extravascular extracellular volume fraction measurement by gadolinium cardiovascular

magnetic resonance in humans: slow infusion versus bolus. *J Cardiovasc Magn Reson* 2011; 13:16

- Schumacher HR. Joint involvement in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Am J Clin Path* 60:593-600,1973.
- Secchi M.E, Sulli A, Pizzorni C, Cutolo M. Nailfold capillaroscopy and blood flow laser-doppler analysis of the microvascular damage in systemic sclerosis: preliminary results. *Reumatismo* 2009; 61(1):34-40
- Seibold: Scleroderma. In *Textbook of Rheumatology*, 1989, 1215-44. WB Saunders, Philadelphia
- Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H et al. "Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma", *J Clin Invest*. 1996; 98: 785-92
- Silman AJ, Howard Y, Hicklin AJ, Black C, "Geographic clustering of scleroderma in south and west London", *Br J rheumatol* 1990; 29: 92-6.
- Smith E et al. "Etiology and pathogenesis of systemic sclerosis", *Rheumatology 1st Ed* Edited by Klipper J, Dieppe P. London, Mosby, 1994.
- Smith JW, Clements PJ, Levisman J, Furst D, Ross M. Echocardiographic features of progressive systemic sclerosis (PSS). *Am J Med*, 1979; 66: 28-33.
- Stacher G, Merio R, Budka C, Schneider C, Smolen J, Tappeiner G, "Cardiovascular autonomic function, autoantibodies, and esophageal motor activity in patients with systemic sclerosis and mixed connective tissue disease", *J Rheumatol* 2000; 27: 692-7.
- Steen V, Medsger T "Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma", *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2437-44.
- Steen VD. "Clinical manifestations of systemic sclerosis", *Semin Cutan Med Surg* 1998; 17: 48-54.

- Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Annals of Rheumatic Diseases* 2007;66:940-944
- Steen V et al. "Epidemiology and natural history of systemic sclerosis", *Rheum Dis Clin N Am* 1990; 16: 1-10.
- Stupi A et al. "Pulmonary hypertension (PTH) in the CREST syndrome variant of progressive systemic sclerosis (PSS)". *Arthritis Rheum* 29:515-524, 1986
- Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;31:196-203
- Sullivan G et al., "Bone marrow transplantation", Blackwell scientific publications 1994; 339-362
- Sykes M et al., "Interleukin-12 inhibits murine graft-versus-host disease". *Blood* 86:2429-2438, 1995
- Szamosi S, Szekanecz Z, Szucs G, "Gastrointestinal manifestations in Hungarian scleroderma patients", *Rheumatol Int* 2006; 26: 1120-1124.
- Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989 ;44:93-151
- Thompson AE, Pope JE, "Increased prevalence of scleroderma in southwestern Ontario: a cluster analysis", *J Rheumatol* 2002; 29: 1867-73.
- Toth R et al., "T cells derived from the skin of patients with systemic scleroderma preferentially utilize the T cell receptor Vbeta3", *Arthritis Rheum* 38: 252; 1995 (suppl.).
- Tzelepis GE, Kelekis NL, Plastiras SC, et al. Pattern and distribution of myocardial fibrosis in systemic sclerosis: a delayed enhanced magnetic resonance imaging study. *Arthritis Rheum* 2007;56:3827—36

- Uitto J, Sollberg S, Peltonen J, Jimenez SA, "Elevated expression of beta-1 and beta-2 integrins intercellular adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1 in the skin of patients with systemic sclerosis of recent onset", *Arthritis Rheum* 1992; 35: 290-8.
- Vaage V et al. Production of collagen type I by mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol.* 1990;48:274-80
- Valentini G, Cuomo G, Abignano G et al. Early systemic sclerosis: assessment of clinical and preclinical organ involvement in patients with different disease features. *Rheumatology* 2011;50:317–23
- Valentini G, Matucci Cerinic M, Valesini G et al., "Reumatologia", UNIREUMA, Idelson-Gnocchi, 2008.
- Valentini G, Vettori S, Cuomo G, Iudici M, D'Abrosca V, Capocotta D, Del Genio G, Santoriello C, Cozzolino D. Early systemic sclerosis: short-term disease evolution and factors predicting the development of new manifestations of organ involvement. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R188
- Valentini G, Matucci Cerinic M, "Disease specific qualità indicators, guidelines and outcome measures in scleroderma", *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25 (47):159-162.
- Valentini G "La sclerosi sistemica in fase precoce. Criteri di definizione e approccio diagnostico", *Rheum*, 2002; 54(1): 9-11.
- Valesini G, Litta A, Bonavita MS, "Geographical clustering of scleroderma in a rural area in the province of Rome", *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11: 41-7
- Varga J, "Fibrosis in systemic sclerosis", Oral presentation, 1° systemic sclerosis world congress, 11 feb 2010.
- Varga J et al. "Transforming growth factor type beta causes a persistent increase in steady state amounts of type I and type III collagen and

fibronectin in mRNAs in normal human dermal fibroblasts". *Biochem J* 1987; 247:597-604.

- Vazquez-Abad D et al, "Autoantibodies in systemic sclerosis". *Int Rev Immunol* 12:145-157,1995
- Vogel-Claussen J, Skrok J, Shehata ML, et al. Right and left ventricular myocardial perfusion reserves correlate with right ventricular function and pulmonary hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. *Radiology* 2011; 258:119-127
- Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis* 2007;66:754–63
- Weston S, Thumshirn M, Wiste J, Camilleri M, "Clinical and upper gastrointestinal motility features in systemic sclerosis and related disorders", *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1085-89.
- White B "Immunopathogenesis of systemic sclerosis", *Rheum Dis Din North Am* 22: 695-708; 1996.
- Whitehead WE, Taitelbaum G et al., "Rectosigmoid motility and myoelectric activity in progressive systemic sclerosis", *Gastroenterology* 1989: 96 (2pt1): 428-32.
- Wigley FM, MD Raynaud's phenomenon : from pathophysiology to treatment. Oral presentation , 1° systemic sclerosis world congress ,13 feb. 2010.
- Yamamoto T et al. "Increased production of nitric oxide stimulated by interleukin-1alfa in peripheral blood mononuclearcells in patients with systemic sclerosis", *Br J Rheumatol* 1998; 37:1123-5.
- Yamamoto T et al. "Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in systemic sclerosis", *J Rheumatol* 1998; 25: 314-7

- Yurovsky W et al., "Restricted T-cell antigen receptor repertoire in bronchoalveolar T cells from normal humans", *Hum Immunol* 50; 22-37; 1996.
- Yurovsky W et al., "Expansion of selected V delta 1⁺ gamma delta T cells in systemic sclerosis patients", *J Immunol* 153; 881-891; 1994.
- Zakrzewska K, Corcioli F, Carlsen KM, Giuggioli D, Fanci R, Rinieri A, Ferri C, Azzi A. *Intervirology* 2009; 52 (5): 279-82