



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
“ Scienze biomediche ”

CICLO XXVII

COORDINATORE Prof. Persio dello Sbarba

***‘Fetal programming’ e patologie reumatiche
autoimmuni:***

il caso della sclerosi sistemica

Settore Scientifico Disciplinare MED/38

Dottorando

Dott.ssa Carolina Amador

Tutore

Prof. Gianpaolo Donzelli

Cordinatore

Prof. Paolo Bonanni

Anni 2012/2014

Indice

Razionale del progetto di ricerca

- Dal ‘fetal programming’ al ‘Developmental Origins of Health and Disease’(DOHaD) pag.4
- Aspetti generali e definizioni cliniche di ‘ambiente fetale avverso’ pag.8
- Meccanismi di adattamento placentare all’ambiente materno-fetale: implicazioni per la crescita in utero pag.18
- Epigenetica e programmazione fetale pag.25
- Nutrizione materno-fetale e modificazioni epigenetiche pag.29
- ‘Fetal programming’: l’immunità dal feto all’adulto pag.33
- L’epigenetica nelle malattie autoimmuni. Nuove evidenze pag.43

‘Fetal programming’ e patologie reumatiche autoimmuni: il caso della sclerosi sistemica

Descrizione del progetto di ricerca

- Introduzione pag.48
- La sclerosi sistemica: caratteristiche generali pag.49

Parte Sperimentale

- Obiettivi pag.63
- Popolazione e Metodi pag.64
- Risultati pag.69
- Discussione pag.72
- Conclusioni pag.74

Analisi Metabolomiche

- La metabolomica clinica pag.79
- Materiali e metodi pag.83
- Risultati pag.84
- Conclusioni e sviluppi futuri di metabolomica pag.90

Dal 'fetal programming' al 'Developmental Origins of Health and Disease' (DOHaD)

Durante la fine degli anni 80' l'epidemiologo inglese David Barker e i suoi colleghi, dall'Università di Southampton (UK), proposero una ipotesi, definita 'fetal origins of adult disease' (FOAD), conosciuta come 'ipotesi di Barker', basata su una serie di studi epidemiologici retrospettivi che descrivevano la potenziale relazione tra la restrizione fetale in utero rappresentata da un basso peso alla nascita e malattie dell'età adulta quali diabete, aterosclerosi, obesità ed ipertensione. (1, 2)

L'ipotesi riconosceva innanzitutto che l'uomo dimostra una plasticità durante lo sviluppo e condizioni avverse in epoche precoci dell'organogenesi possono cambiare in maniera permanente la struttura di organi e apparati, secondo un fenomeno che fu definito 'fetal programming'. (3)

Una delle condizioni avverse a cui può essere sottoposto un feto durante il suo sviluppo in utero, è rappresentata dalla malnutrizione. Il corretto sviluppo dell'organismo dipende dal passaggio dalla madre al feto di appropriate quantità di ossigeno e nutrienti durante la gestazione. Questa risorsa dipende dalla composizione materna, la quantità di cibo che assume durante la gravidanza, nonché dai depositi di nutrienti, la capacità di trasportarli. Se la domanda di nutrienti supera l'offerta, il feto risulterà malnutrito. (4)

Lo sviluppo fetale, che si ha a partire dalla nona settimana dal concepimento, dà inizio alla fase di rapida crescita che progredisce fino alla fine della gravidanza. La principale caratteristica della crescita fetale è la divisione cellulare durante cui tessuti di differente origine, si sviluppano rapidamente. Questi periodi, cosiddetti 'critici', sono periodi brevi, che avvengono per la maggior parte dei sistemi in utero e in tempi diversi per diversi organi o apparati. La gran parte dello sviluppo organico si completa nei primi 1000 giorni dal concepimento. (5)

Il feto risponde alla carenza di nutrienti rallentando la divisione cellulare proprio in quei tessuti che si trovano in quel momento nel periodo critico. La grande capacità di Barker e colleghi fu quella di comprendere che l'organismo conserva memoria di un insulto precoce che si traduce in patologia in epoche successive, ed è questo il modo in può essere programmato. (6)

Con tale ipotesi si passò dal vecchio modello della malattia degenerativa basata sull'interazione tra i geni e l'ambiente nella vita adulta, ad un nuovo modello che contemplava una programmazione da parte dell'ambiente fetale e fu riconosciuto che, la dieta materna durante la gravidanza, era in grado di programmare il prodotto del concepimento.

La teoria della FOAD, diede origine ad un gran numero di ricerche epidemiologiche di corti umane che ne supportarono la validità (7,8) e tra queste, una di quelle maggiormente documentate, è stata quella della 'fame olandese' meglio conosciuta come 'Dutch Famine Birth Cohort Study'. (9)

Tra il novembre 1944 e maggio 1945, la parte ovest dell'Olanda subì una severa restrizione delle riserve di cibo a causa dell'embargo impostogli dall'Asse della seconda guerra mondiale: la razione giornaliera si ridusse a soli 400-800 Kcal determinando la morte di più di 18000 tra donne e bambini e la nascita di molti neonati con basso peso e restrizione fetale. (10) Questo breve ma ben definito periodo di carestia ha rappresentato una opportunità unica per studiare gli effetti indotti dalla iponutrizione materna grazie all'esistenza di cartelle cliniche contenenti dati inerenti il periodo periconcezionale (età gestazionale e peso alla nascita) e il decorso della gravidanza materna (nutrizione materna). Lo studio rivelò che i bambini nati in questo periodo, sviluppavano da adulti alterazioni metaboliche tra cui alti livelli di trigliceridi e colesterolo, diminuita tolleranza al glucosio, aumentato 'body mass index' (BMI) con conseguente aumento del rischio di malattia coronarica. (11, 12)

Gli studiosi osservarono inoltre che le conseguenze erano diverse in base alle diverse epoche gestazionali in cui le mamme erano state colpite dalla carenza nutrizionale. I neonati le cui mamme erano state interessate verso la metà o l'ultima parte della gravidanza, ebbero un peso normale alla nascita e da adulti dimostrarono sviluppare un'alterata tolleranza al glucosio. Mentre i soggetti le cui mamme erano state sottoposte alla fame in un momento precoce della gravidanza dimostrarono un aumentato BMI e un profilo lipidico maggiormente aterogenico.(9, 13)

Fu in un secondo momento che lo stesso Barker in accordo con Hales, tentò di dare una spiegazione al fenomeno della programmazione con il concetto del 'fenotipo frugale' ('thrifty phenotype'): il feto risponde ad un ambiente 'povero' con cambiamenti irreversibili della sua traiettoria di sviluppo che comportano un rallentamento della crescita. (14)

L'idea del 'fenotipo frugale' è poi evoluta verso un modello che considera il 'vantaggio adattativo del programming'. Le 'risposte predittive di adattamento' (predictive adaptive responses: PARs) sono quei cambiamenti della traiettoria dello sviluppo che non avvengono in realtà solo per ottenere un vantaggio momentaneo, ma anche futuro. I PARs possono essere distinti in adeguati o inadeguati. (15) I PARs adeguati sono quelli in cui la gamma delle risposte fisiologiche che l'organismo è in grado di mettere in atto, gli permettono di combattere l'ambiente circostante con un basso rischio per la salute e lo sviluppo di malattia. Quando i meccanismi adattativi risultano inadeguati, il rischio di malattia in epoche successive aumenta. I PARs possono essere indotti solo durante periodi finestra critici quando cioè sono ancora in atto i meccanismi della plasticità dello sviluppo. (16)

Innescando dei meccanismi di adattamento all'ambiente quali la diminuzione del letto vascolare, riduzione del numero di nefroni, alterazioni della secrezione dell'insulina, il

feto limita le proprie dimensioni ed è in grado di conservare le poche energie disponibili per le funzioni cardiache e lo sviluppo neuronale. (17)

In questo modo viene programmato a rispondere ad un ambiente futuro altrettanto 'povero' e ostile, tuttavia l'ambiente dell'infanzia e poi della vita adulta cambiano e differiscono bruscamente da quello prenatale, ma l'organismo ha ormai perso la capacità di adattarsi ad un ambiente più 'ricco'.

Quando esiste un 'mismatch' ovvero una discrepanza tra l'ambiente uterino e quello extrauterino, si creano le basi per la predisposizione a malattie nell'età adulta poiché il setting fisiologico stabilito durante le fasi plastiche e predittive, non si rivela poi appropriato per l'ambiente in cui l'organismo maturo si trova a vivere. (18)

Negli ultimi anni ulteriori sviluppi nell'argomento, hanno esteso queste idee alla teoria delle 'developmental origins of health and disease' (DOHaD), ovvero 'le origini dello sviluppo della salute e della malattia'. Il cambiamento di nome sottolinea il riconoscimento del ruolo sia dell'ambiente pre che post-natale nel plasmare traiettorie di sviluppo che influenzano la salute a lungo termine. (19)

La teoria delle DOHaD abbraccia discipline diverse, tra cui la medicina evoluzionistica, l'antropologia, la pratica clinica e la sanità pubblica ed esamina come "fattori ambientali che agiscono durante la fase di plasticità dello sviluppo interagiscono con le variazioni genotipiche per modificare la capacità dell'organismo di far fronte all'ambiente in età avanzata". Questa linea di pensiero si è principalmente occupata di studiare gli insulti nutrizionali connessi con la manifestazione di malattie croniche della vita adulta quali la sindrome metabolica o il diabete tipo 2. (20,21)

Aspetti generali e definizioni cliniche di ‘ambiente fetale avverso’

Le evidenze sperimentali rivelano che il fattore ambientale in assoluto più importante nel regolare la crescita fetale negli animali così come nell'uomo, sia la disponibilità di nutrienti. (22)

Se ne deduce che le dimensioni fetali e le traiettorie di crescita sono degli importanti indicatori della salute fetale. Le anomalie della crescita fetale sono comunemente diagnosticate usando criteri clinici quali la restrizione di crescita intrauterina, piccolo per età gestazionale, grande per età gestazionale, il basso peso alla nascita. (23)

Il termine di restrizione fetale intrauterina o IUGR (intra-uterine growth restriction) indica una diminuita crescita e sviluppo del feto e/o dei suoi organi durante la gestazione. (24) **(Figura 1)**

Più specificamente, IUGR si riferisce ad un feto che non raggiunge in utero il suo potenziale di crescita genetico a causa di un insulto patologico, per cui risulta ‘ristretto nella crescita’. (25)

L'insulto esterno responsabile della restrizione di crescita può essere materno, fetale o placentare, essendo però l'insufficienza placentare di gran lunga l'eziologia predominante. In generale la restrizione fetale che inizia fin dalle prime fasi della gravidanza dà origine a feti proporzionatamente piccoli (restrizione fetale simmetrica) in cui risultano diminuiti contemporaneamente il peso, la lunghezza e la circonferenza cranica (CC); mentre i feti che subiscono restrizione nel secondo o terzo trimestre di gravidanza si dicono sproporzionati (restrizione fetale asimmetrica) potendo presentare ad esempio solo un peso inferiore agli standard ma lunghezza e CC nella norma. (26, 27)

Le sproporzioni della crescita asimmetrica riflettono un flusso preferenziale al cervello ('brain sparing') che dà origine ad un feto con dimensioni della testa relativamente normali e dimensioni corporee al di sotto della norma. (28)

Diversi studi sostengono l'ipotesi che la restrizione fetale asimmetrica sia quella collegata ad outcomes peggiori in epoche successive. (29)

Nei paesi in via di sviluppo, la IUGR è principalmente la conseguenza di uno scarso stato nutrizionale materno prima o durante la gravidanza che comporta una deprivazione di nutrienti per il feto di lunga durata, mentre nei paesi industrializzati la IUGR è piuttosto la conseguenza di un mancato aumento del normale flusso materno che determina 'insufficienza placentare'. (30, 31)

Si stima che i neonati IUGR rappresentino il 5% di tutte le nascite negli Stati Uniti e l'11% di tutti i neonati nei paesi sottosviluppati, da cui si deduce che la malnutrizione materna è una importante causa di restrizione fetale a livello mondiale. (32)

La condizione di IUGR si associa ad un aumento della mortalità e morbidità neonatale legato sia ad eventi avversi perinatali (prematùrità, paralisi cerebrale, morte fetale in utero, morte neonatale) che a condizioni patologiche dell'età adulta (obesità, ipertensione, diabete tipo 2). (33-35)



Figura 1: neonato IUGR

L'acronimo inglese SGA 'small for gestational age', indica il bambino piccolo per età gestazionale. La corretta definizione di SGA, si basa su alcuni valori biometrici e richiede la conoscenza dell'età gestazionale basata su un esame ecografico nel primo trimestre di gravidanza, l'accurata determinazione dei parametri auxologici alla nascita (peso, altezza, circonferenza cranica) e dati di riferimento per una determinata popolazione. (36)

Secondo le più recenti linee guida si definisce SGA, quel neonato con peso e/o lunghezza inferiori a -2 deviazioni standard (DS) o al 3° percentile rispetto ai limiti di riferimento per età gestazionale. Seppure questa sia la definizione raccomandata, nella pratica neonatologica, generalmente si usa identificare come SGA il neonato con peso alla nascita inferiore al 10° percentile per sesso ed età gestazionale. (37, 38)

Si considerano invece adeguati per l'età gestazionale, 'appropriate for gestational age' (AGA), i neonati con peso e lunghezza compresi tra il 10° e il 90° percentile per l'età gestazionale e grandi per l'età gestazionale, 'large for gestational age (LGA)' o macrosomi, i neonati con peso e/o lunghezza superiori al 90° percentile.

A volte i termini IUGR e SGA, vengono usati indifferentemente dando spesso origine a misclassificazioni che possono rendere difficile l'interpretazione di dati e studi.

Infatti sebbene questi termini possano essere interscambiabili, non sono equivalenti.

IUGR si riferisce ad una decelerazione della traiettoria di crescita in utero, mentre SGA si riferisce alla grandezza del neonato alla nascita non tenendo conto della precedente traiettoria di crescita. Inoltre la condizione di IUGR non necessariamente comporta o esita in un feto SGA, (38) così come non tutti i feti SGA hanno subito in utero una restrizione fetale, poiché alcuni di essi possono essere costituzionalmente piccoli.

Per fare un esempio, un feto la cui traiettoria di crescita fallisce e invece di raggiungere il 60° percentile di peso stimato e si trova sequenzialmente al 50°, 40° e 30° percentile con l'avanzare delle settimane di gestazione, potrebbe essere classificato come IUGR, ma non come SGA. (34)

Si ritiene che a livello mondiale, circa il 3-10% dei neonati sia da considerarsi SGA, sebbene per colpa delle misclassificazioni sopracitate, si stima che la percentuale possa essere maggiore.

Il basso peso alla nascita si definisce come un peso inferiore a 2500 g indipendentemente dall'età gestazionale ed è un parametro universale potendo essere applicato a tutte le popolazioni di qualsiasi etnia come stabilito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. Un peso basso alla nascita può essere il risultato di una crescita inappropriata in utero, di una nascita pretermine o della combinazione di entrambe. (40)

La percentuale di basso peso è geograficamente determinata, riflettendo in parte le differenze nel peso alla nascita tra le popolazioni e si rivela stabile nella maggior parte dei paesi: in Europa, la percentuale di neonati con peso inferiore ai 2500 g varia tra il 4% e il 9%. (41)

Le condizioni di IUGR o SGA, possono accompagnarsi o meno alla nascita pretermine.

Il neonato si definisce pretermine se nasce prima di aver completato la 37^o settimana di gestazione. (42)

Si stima che l'incidenza della nascita pretermine sia aumentata negli ultimi anni in rapporto all'aumento delle gravidanze multiple provocate dalla diffusione delle pratiche di procreazione assistita ed è dell'ordine del 12-13% negli USA e del 5-9% in altri paesi industrializzati. (43)

Eziologia

Le considerazioni fatte finora permettono di dedurre che la restrizione fetale non sia di per sè una malattia, piuttosto la manifestazione di alcuni fattori materni e fetali che portano ad una scarsa crescita. (44)

Non sempre è possibile distinguere l'eziologia di una restrizione fetale. Tuttavia è possibile riassumere le principali cause in 4 categorie: (39)

- 1- Deficit generale di substrati nutritivi al feto che solitamente inficia nella crescita durante gli ultimi periodi della gestazione.
- 2- Lesioni tossiche: esposizione del feto ad agenti chimici quali tabacco, droghe o infezioni, che generalmente agiscono nel primo trimestre di gravidanza.
- 3- Anomalie genetiche o cromosomiche (es. Sindrome di Down, alterazioni del gene IGF-I)
- 4- Cause non note, IUGR idiopatico

Un'altra classificazione suddivide le cause in materne, fetali, placentari. (**Tabella 1**)

In base alla severità con la quale agiscono gli stimoli esterni, le conseguenze possono essere estreme ed indurre l'interruzione dello sviluppo e avere un effetto teratogeno, o il feto può rispondere con un processo di 'developmental plasticity', adattando l'organismo ad un ambiente adulto che viene predetto dalle condizioni delle prime fasi di vita. (45)

E' stato anche provato che il rischio di IUGR è maggiore tra le donne con basso indice di massa corporea (body mass index: BMI) prima della gravidanza, bassa statura, anemia e tra coloro che mostrano deficit nutritivi e uno scarso aumento di peso durante la gestazione. (46, 47)

Cause di restrizione di crescita intrauterina

Materne

Età materna (< 16; > 35) ?
Altezza materna
Peso materno
Condizioni socio-economiche sfavorevoli
Parità (nulliparità, grande pluriparità)
Malnutrizione
Sostanze d'abuso (fumo, alcol, droghe)
Ipertensione, pre-eclampsia
Patologie croniche: diabete mellito, endocrinopatie, collagenopatie, nefropatie, cardiovasculopatie, anemie.
Neoplasie
Malformazioni, malformazioni uterine
Infezioni (in particolare complesso TORCH)

Placentari

Anomalie anatomiche
Anomalie di inserzione (placenta previa, distacco occulto)
Anomalie funicolari (compressione cronica, trombosi dei vasi ombelicali, inserzione velamentosa)
Insufficiente perfusione utero-placentare

Fetali

Anomalie cromosomiche
Malattie genetiche
Malattie metaboliche congenite
Infezioni (in particolare complesso TORCH)

Tabella 1: Cause di restrizione di crescita intrauterina

(Ghirri et al 2010; Rivista Italiana di Medicina dell'Adolescenza Vol.8 n. 3)

Tra le alterazioni indotte da agenti tossici, il fumo materno rimane il fattore principale che limita la crescita di un feto. (48)

Gli effetti del fumo materno sembrano essere dose-correlati : è stato dimostrato infatti che, l'abitudine al fumo, in media 13 sigarette/die, riduce le dimensioni corporee alla nascita, riducendone la lunghezza e alterandone anche la circonferenza cranica e questo rallentamento della crescita è già riconoscibile e misurabile a 30 settimane di gestazione.

(49, 50)

Persino il fumo passivo sembra influenzare la crescita in utero e i suoi effetti avversi sia materni che fetali sono stati ben studiati. (51)

Nel loro studio Ko e coll., hanno trovato che il fumo materno diminuisce il peso alla nascita. Confrontate con il gruppo di non fumatrici, le donne che fumavano avevano una

più alta incidenza di basso peso, SGA, e nascite pretermine, specialmente se la mamma fumava > 20 sigarette/die. Anche l'associazione con il fumo paterno è risultata significativa. Gli autori concludevano che il fumo materno è responsabile dell'aumentata incidenza di basso peso e di nascita pretermine dei neonati, da cui l'importanza di educare le donne alla sospensione del fumo in gravidanza per diminuire la morbilità e mortalità ad esso correlate. (52)

Sazak e i suoi ricercatori hanno descritto che il numero di sigarette in gravidanza correla con i livelli di eritropoietina nel cordone ombelicale e questo processo potrebbe essere il responsabile di ipossia fetale e restrizione di crescita. (53)

In Spagna una corte di studio molto vasta ha seguito la crescita di 2478 feti misurandone il diametro biparietale, lunghezza del femore, circonferenza addominale e il peso stimato alle 12, 20, 34 settimane di gestazione. Le donne che continuavano a fumare anche dopo la 12° settimana di gravidanza mostravano parametri di crescita diminuiti già alle 20 settimane con conseguente restrizione fetale alle 34 settimane. La riduzione era maggiore nella lunghezza del femore e nella circonferenza addominale. (54)

Infine gli ultimi studi hanno chiaramente mostrato che il fumo materno in gravidanza si associa con infezioni delle vie respiratorie, morte improvvisa del lattante, problemi comportamentali e deficits neurocognitivi. (55)

Conseguenze a lungo termine

I neonati SGA sono a maggior rischio di morbidità e mortalità perinatale (56) e coloro che sopravvivono sono a maggior rischio di malattie nell'età adulta tra cui diabete e diverse patologie croniche. (57) (**Tabella 2**)

I piccoli per età gestazionale raggiungono una statura definitiva più bassa, hanno un aumentato rischio di obesità, malattie cardiovascolari, insulino resistenza, diabete mellito di tipo 2. (58)

Una programmazione del pancreas sarebbe responsabile delle conseguenze osservate nelle cellule Beta pancreatiche come confermato da uno studio sui nati IUGR che ha rivelato in questa categoria di bambini una diminuita produzione di insulina e un minor numero di cellule Beta nonché un loro malfunzionamento. (59, 60)

Nei bambini di peso molto basso (<1500 g), il sistema tiroideo risulta immaturo in diverse sue parti e poiché gli ormoni tiroidei giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo e nelle funzioni del sistema nervoso centrale, questa immaturità potrebbe essere la causa delle sequele neurologiche e degli alterati QI riscontrati nei follow-up di questi bambini. (61)

Tuttavia, nonostante le dimensioni e le proporzioni alla nascita siano spesso un surrogato di influenze esterne che programmano il feto, è pur vero che il 'fetal programming' può avvenire anche in assenza di evidenti effetti antropometrici perinatali. (62)

Complicanze perinatali in neonati a termine e pretermine SGA/IUGR
Aumentata mortalità perinatale (ipossia cronica, asfissia perinatale, anomalie congenite)
Asfissia perinatale
Sindrome da aspirazione di meconio
Ipotermia
Ipertensione polmonare persistente
Emorragia polmonare
Ipoglicemia
Iperglicemia
Policitemia/iperviscosità
Enterocolite Necrotizzante (NEC)
Trombocitopenia
Neutropenia
Outcome e conseguenze a lungo termine
Maggior numero di giorni di degenza alla nascita
Maggiore frequenza di re-ospedalizzazione
Ridotto catch-up growth (SGA simmetrici)
Deficit neurologici minimi
Alterazioni minime della coordinazione
Aumentata incidenza di deficit di attenzione e iperattività
Maggior rischio di deficit neurologici gravi nel pretermine
Alterazioni endocrino-metaboliche (insulino-resistenza/iperinsulinemia, dislipidemia, obesità, diabete tipo II)
Ipertensione, malattie cardio-vascolari

Tabella 2: Complicanze perinatali e a distanza del neonato SGA/IUGR
 (Ghirri et al 2010, Rivista Italiana di Medicina dell'Adolescenza Vol.8 n. 3)

Meccanismi di adattamento placentare all'ambiente materno-fetale: implicazioni per la crescita in utero

La normale crescita in utero dipende dal potenziale genetico del feto che viene modulato da fattori ormonali ed ambientali multipli regolandone la sopravvivenza e lo sviluppo; tra questi in primis la salute e la nutrizione materna. (63)

E' noto che la nutrizione fetale è un importante predittore dell'outcome della gravidanza e riflette l'interazione tra fattori fisiologici e patologici che influenzano il feto. (64, 65)

Se ne deduce che la malnutrizione materna durante la gravidanza, può risultare in un gran numero di problemi sia nella madre che nel feto. **(Figura 1)**

La placenta è dunque l'organo critico per la crescita fetale e il benessere durante la gravidanza. Oltre a regolare la nutrizione fetale essa agisce come un organo endocrino in grado di sintetizzare e secernere ormoni tra cui estrogeni, progesterone, gonadotropina corionica e lattogeno placentare. Inoltre rappresenta una barriera protettiva nei confronti di agenti tossici e ha delle funzioni metaboliche/detossificanti simili a quelle del fegato. In altre parole la placenta è uno dei più importanti determinanti dell'ambiente in cui si attua la crescita fetale (66) e il 'fenotipo placentare' è ritenuto da alcuni autori essere la migliore dimostrazione dell'ambiente in cui è avvenuta la crescita fetale. (67) **(Figura 2)**

La placenta umana è costituita da una parte materna o decidua ed una fetale, ossia il corion. La crescita fetale dipende dall'apporto di nutrienti che a sua volta dipende dal trasporto di substrati e dalla sua regolazione. Questi processi sottendono anche alle caratteristiche morfologiche stesse della placenta, tra cui l'estensione della superficie di assorbimento, la morfologia placentare, il flusso di sangue e la vascolarizzazione.

Il sangue della madre rifornisce la placenta attraverso le arterie spirali che lo spingono direttamente nello spazio intervilloso. La capacità di rifornimento di sangue si stabilisce alla fine del primo trimestre: affinché il flusso di sangue aumenti parallelamente con la

crescita placentare, è fondamentale che le cellule trofoblastiche migrino nelle arterie spirali durante la prima metà della gravidanza portando alla degenerazione delle cellule elastiche e muscolari nelle pareti delle arterie spirali e rimpiazzando le cellule endoteliali. Questo processo si completa normalmente intorno alla 16°-18° settimana di gestazione e trasforma le arterie spirali in vasi dilatati poco responsivi alla vasocostrizione. (45)

Studi morfologici mostrano che nelle gravidanze con IUGR che si associano a preeclampsia, il rimodellamento della vascolarizzazione materna delle arterie spirali del miometrio è compromesso a causa di una incompleta invasione da parte delle cellule trofoblastiche. (68, 69)

Il trasporto di sostanze attraverso la barriera placentare può avvenire con diversi meccanismi : a) trasporto passivo sia per semplice diffusione (O₂, ormoni steroidei) che per diffusione facilitata (mediata da proteine trasportatrici senza necessità di energia) come avviene nel trasporto del glucosio; b) trasporto attivo: amminoacidi e acido folico catturati dai recettori vengono trasportati al sangue fetale; c) trasporto vescicolare, con cui molecole di grandi dimensioni come le immunoglobuline vengono catturate dai villi. (70)

Può accadere ad esempio che cambiamenti nella struttura placentare nel corso della gravidanza inducano una inattivazione di proteine trasportatrici ed enzimi del metabolismo fondamentali per la regolazione della nutrizione fetale con conseguenze a lungo termine. Numerosi studi sull'argomento hanno dimostrato che nella placenta con restrizione di crescita, vi è una riduzione significativa nel flusso transplacentare fetale di amminoacidi essenziali. (71, 72)

Il momento in cui la noxa esterna viene ad agire, sbilanciando la nutrizione, sembra avere non poca importanza visto che gli studi animali suggeriscono che la fase precoce della gravidanza, fino alla metà della stessa, rappresenta il periodo critico quando i deficit di

micronutrienti, hanno il maggior impatto negativo nella crescita fetale e nello sviluppo. (73-75)

Evidenze mostrano infatti, che l'embrione/feto è più vulnerabile al deficit materno di proteine o amminoacidi durante il primo periodo che segue l'impianto e durante quello di rapido sviluppo placentare. (76)

In realtà, sia la iponutrizione che la ipernutrizione possono essere classificate come forme di malnutrizione perchè entrambi gli estremi nutrizionali sono comunemente caratterizzati da:

- 1) Sbilanciamento di nutrienti(amminoacidi, vitamine e minerali)
- 2) Livelli elevati di cortisolo nel sangue
- 3) Stress ossidativo

Le conseguenze della ipernutrizione sono al momento meno studiate rispetto a quelle della sottanutrizione, ma anche una eccessiva disponibilità di nutrienti può determinare un ritardo di crescita nel modello animale.(77)

Nello studio di Handerson e colleghi, l'obesità materna è risultata un fattore di rischio statisticamente significativo indipendente (95% IC 1.11–1.39) per la nascita SGA, rispetto al normopeso. Anche un'età materna ≥ 35 anni, i disordini ipertensivi e il fumo si sono rivelati fattori di rischio per questa alterazione della crescita. (78)

Inoltre diete in gravidanza ad elevato contenuto di carboidrati si associano a neonati di basso peso e a sviluppo di ipertensione arteriosa nella mezza età. (79-81)

I modelli di imprinting animali in cui vi è mancata corrispondenza tra le dimensioni placentari e quelle del feto, hanno permesso negli ultimi anni, di rilevare la grande importanza dei 'segnali di richiesta' del feto nel suo sviluppo placentare. (82) **(Figura 3)**

La placenta risponde a questi segnali di richiesta con meccanismi di adattamento del flusso sanguigno, della superficie di scambio o dell'attività di trasporto.

Gli adattamenti placentari indotti da un ambiente materno-fetale sfavorevole, avvengono normalmente con lo scopo di ottimizzare lo sviluppo fetale e di massimizzare il tasso di sopravvivenza fino alla nascita. Tuttavia essi possono anche indurre effetti secondari devastanti come ad esempio aumentare la resistenza vascolare o indurre un metabolismo placentare anomalo. Insieme agli effetti più diretti dell'alterata composizione di nutrienti, gli adattamenti placentari possono avere conseguenze a lungo termine negli organi fetali portando una programmazione dei 'set-points' omeostatici per tutta la vita. (83, 84)

Vi sono evidenze ad esempio, per cui una malnutrizione generalizzata, sia pre che post-concepimento, accelera la maturazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandole surrenali e induce la nascita pretermine. (85)

Anche le alterazioni nel trasporto di glucosio attraverso la placenta osservate nelle condizioni di IUGR o ipossia offrono un modello di adattamento ai segnali di richiesta. (86)

Il trasporto materno di glucosio attraverso la placenta infatti, dipende dal gradiente di concentrazione tra madre e feto, e nella gravidanza che decorre con IUGR il feto si adatta ad una ridotta superficie placentare inducendo un maggior uptake di glucosio dalla placenta aumentando così il gradiente transplacentare: questo semplice meccanismo di adattamento, potrebbe essere la base di un imprinting nel metabolismo del glucosio. (87)

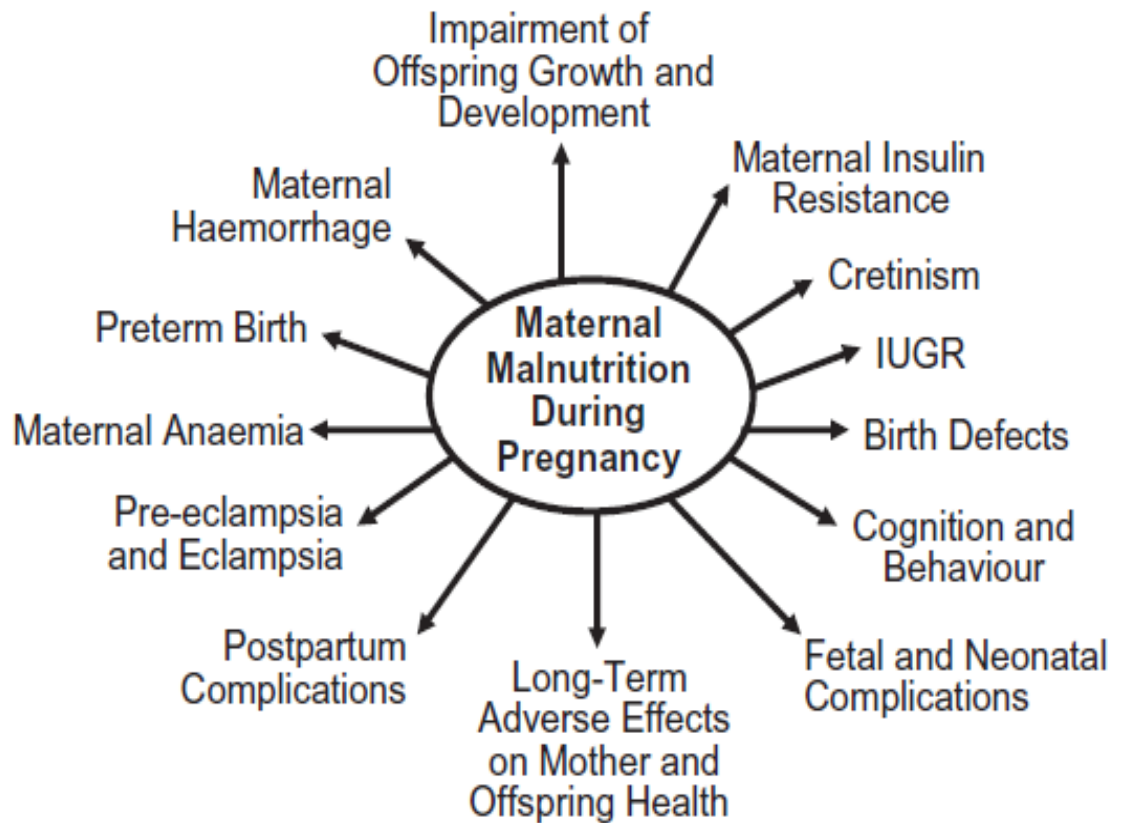


Figura 1. Principali effetti negativi della nutrizione materna nella madre e nel feto

(Wu G et al 2012; Pediatric and Perinatal Epidemiology)

Sia la iponutrizione che la ipernutrizione nella donna in gravidanza possono avere delle conseguenze negative sulla salute materno-fetale e degli affetti a lungo termine sulla salute della progenie.

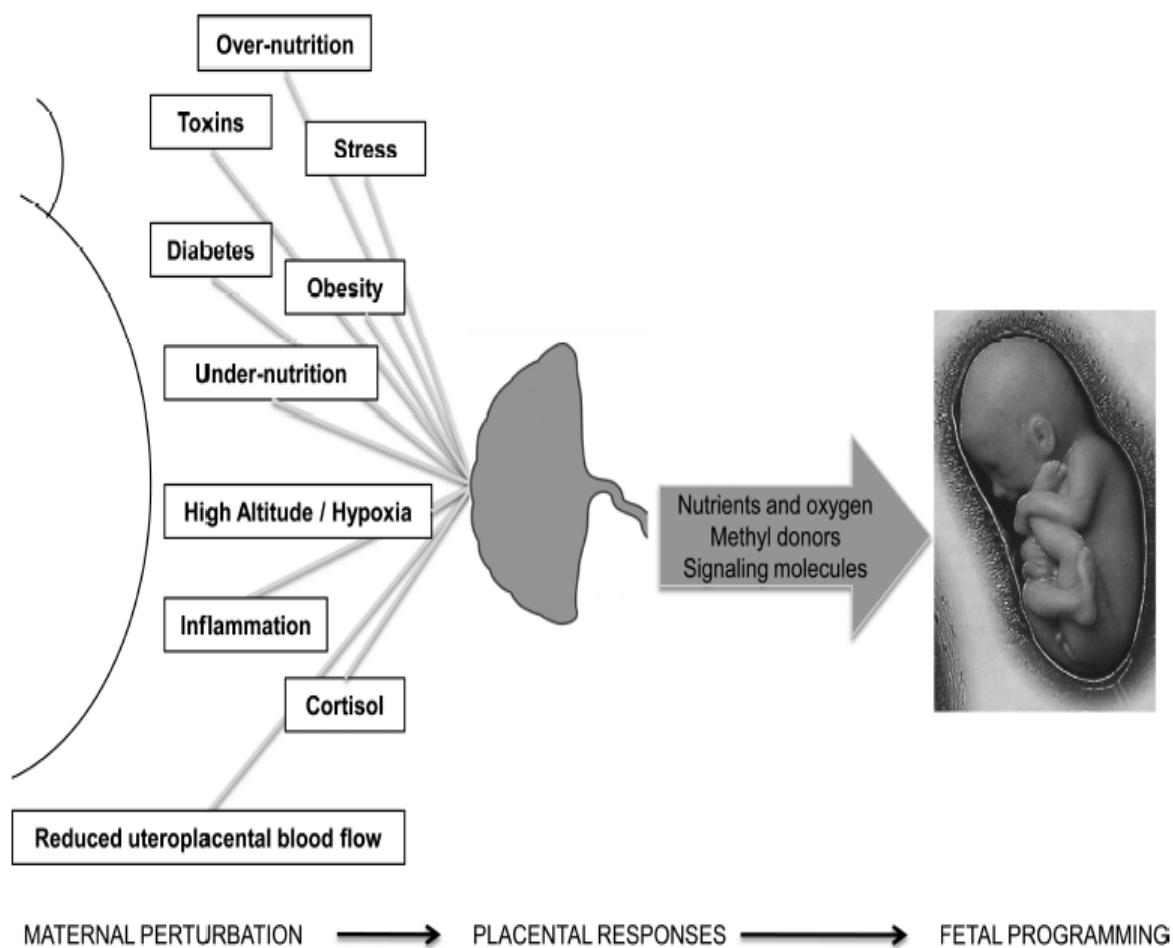


Figura 2. Il ruolo critico della placenta nel ‘fetal programming’
 (Jansson T et al 2013; Clin Obstet Gynecol)

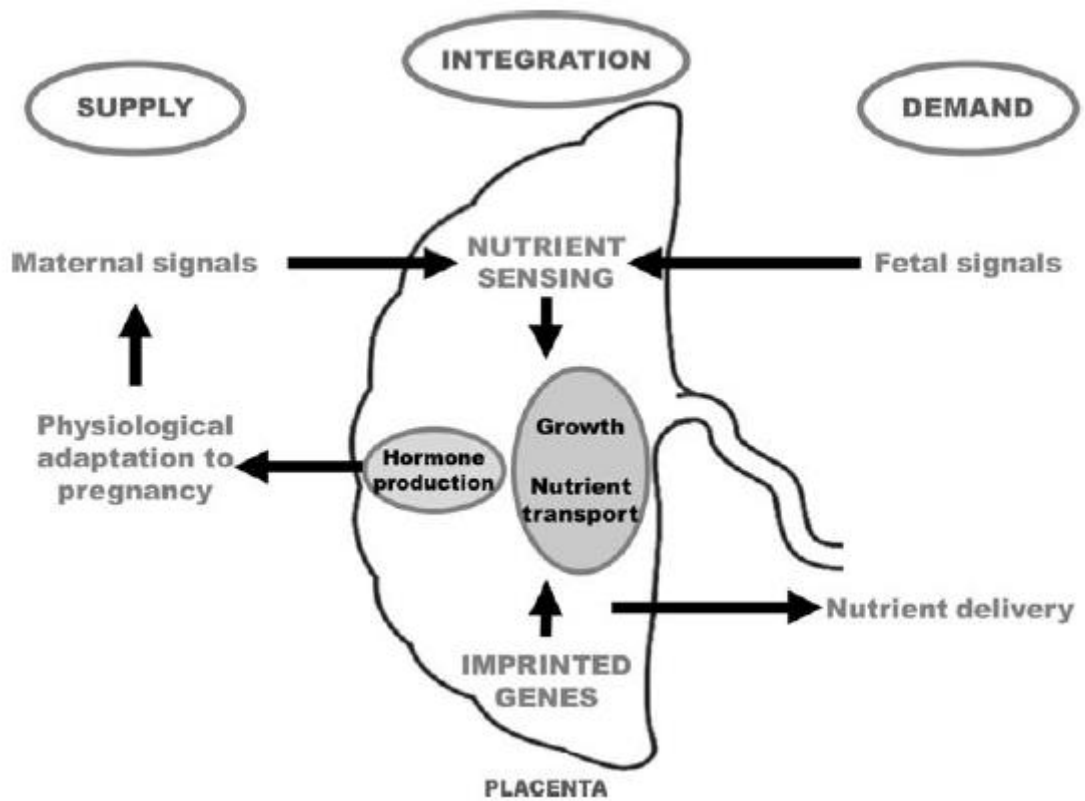


Figura 3. Modello placentare della ‘percezione della nutrizione’: la placenta come sensore di nutrienti.

(Díaz P et al 2014; Biology of Reproduction)

La placenta integra una moltitudine di segnali materni e fetali con informazioni intrinseche per regolare la necessità di nutrienti. L'imprinting di geni determinerà la capacità funzionale della placenta per tutta la gravidanza.

Epigenetica e programmazione fetale

Il termine 'epigenetica' fu usato per la prima volta da Waddington per indicare delle vie con cui l'ambiente in cui avviene lo sviluppo di un organismo, ne influenza il suo fenotipo maturo. Il suo lavoro sulla plasticità dello sviluppo, così come quello di altri autori, nasceva dalle osservazioni che, le influenze ambientali durante lo sviluppo, possono indurre fenotipi diversi a partire da uno stesso genotipo. (88)

Con la definizione di 'epigenetica' ci si riferisce oggi a cambiamenti stabili ed ereditabili dell'espressione genica che non sono mediati da alterazione nella sequenza del DNA. (89)

Gli organismi pluricellulari sono costituiti di cellule genotipicamente identiche ma fenotipicamente diverse e la differenziazione cellulare è il risultato di una diversa espressione dei patterns esistenti in queste cellule di diverso tipo. L'espressione di cellule tessuto-specifiche è in parte dovuta ad un controllo epigenetico. (90)

I principali processi epigenetici comprendono la metilazione del DNA e le modificazioni a carico degli istoni (acetilazione, metilazione, fosforilazione) che, alterando la struttura della cromatina interferiscono con la trascrizione di specifici fattori e proteine regolatrici. (66)

Più di recente, sono stati identificati anche altri meccanismi epigenetici che coinvolgono i microRNA (miRNAs): piccole molecole endogene di RNA non codificante, attive nella regolazione trascrizionale e post-trascrizionale dell'espressione genica; essi fanno parte di una più grande rete di geni che regolano importanti processi cellulari quali lo sviluppo embrionico, la differenziazione, il ciclo cellulare, l'apoptosi e alcune funzioni immunitarie. (91, 92)

Al contrario delle informazioni genetiche, che sono estremamente stabili, le modificazioni epigenetiche rappresentano l'effetto di eventi che hanno luogo

nell'ambiente in epoche molto precoci e assicurano delle risposte durature ma reversibili a stimoli transitori modificando l'espressione genica e il fenotipo della vita adulta. Quindi in contrasto con il codice genetico, l'informazione epigenetica conserva un certo livello di plasticità ed è interamente reversibile. (93)

Una cospicua quantità di studi suggerisce ormai che la regolazione epigenetica dei geni sia influenzata dall'ambiente e può essere uno dei meccanismi molecolari che giocano un ruolo importante nel 'fetal programming'. (94)

Queste alterazioni epigenetiche indotte dall'ambiente possono essere mantenute a lungo, influenzare l'espressione genica e causare cambiamenti nei tratti fenotipici. (95) Diversi sono gli studi che supportano l'ipotesi per cui le modificazioni epigenetiche sono sensibili agli stimoli ambientali. Ne sono una prova i gemelli monozigoti che possiedono un identico genotipo, ma sono fenotipicamente diversi e mostrano una diversa età di insorgenza di malattie. Questo può essere spiegato da un accumulo di cambiamenti epigenetici nel corso della loro vita: nei gemelli in età adulta sono state riscontrate grandi differenze nella metilazione di citosine e acetilazione di istoni, mentre erano risultati epigeneticamente indistinguibili in giovane età. (96)

La metilazione del DNA, è tra i meccanismi epigenetici, quello maggiormente studiato e comunemente misurato nelle varie popolazioni di studio. Si tratta in realtà di un processo naturale già che dalle prime fasi dell'embriogenesi il DNA va in contro normalmente a meccanismi di metilazione e demetilazione che hanno lo scopo di 'etichettare' i geni di origine materna e paterna nella prole. (97)

La metilazione nei mammiferi e in altri vertebrati, avviene tipicamente in posizione 5' di un residuo di citosina localizzato in un dinucleotide CpG. I dinucleotidi CpG risultano per la maggior parte, normalmente metilati, tuttavia, quelli che si raggruppano con alta densità in specifiche regioni promotrici dei geni (CpG islands), sono privi di metilazione. La metilazione di queste regioni (CpG islands) comporta il silenziamento della

trascrizione del gene associato (98) e quando questo accade durante il periodo di differenziazione precoce, può giocare un ruolo nella programmazione di geni che codificano per singole cellule o per tessuti specifici. (99)

Le alterazioni epigenetiche costituiscono dunque un attraente meccanismo di evoluzione attraverso cui il feto e la placenta sono in grado di adeguarsi alle condizioni ambientali, in quest'ottica l'epigenetica si prefigura come una pietra miliare nello studio dell'origine uterina delle patologie dell'adulto e possibilmente potrà rivelare dei punti di intervento.

(Figura 1)

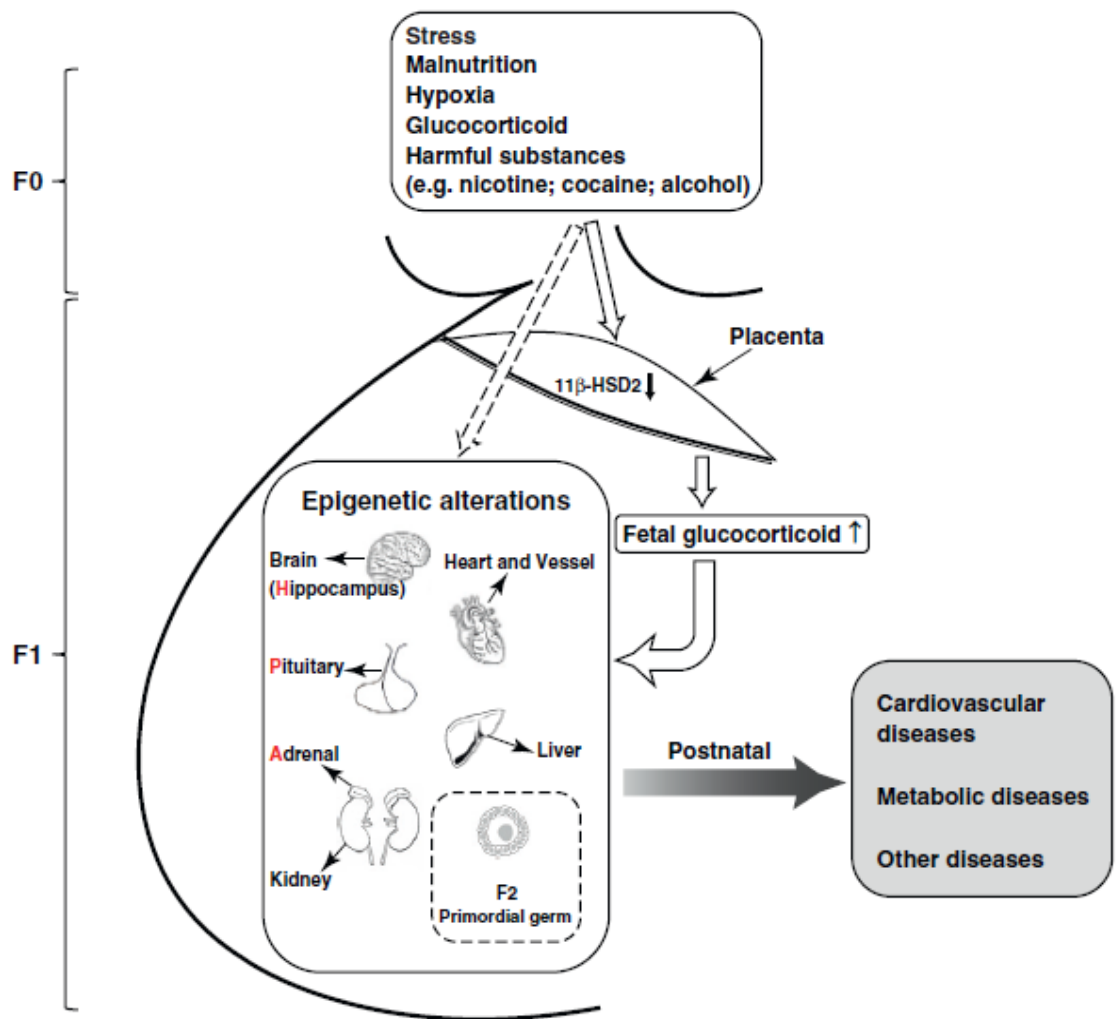


Figura 1. Meccanismi epigenetici nel ‘developmental programming’ delle malattie dell’adulto

(Chen M et al 2011; Drug Discovery Today)

Un ambiente avverso in utero causato da stress materno, malnutrizione, ipossia o esposizione a sostanze tossiche comporta modificazioni epigenetiche che determinano l’insorgenza di malattie in età adulta.

Nutrizione materno-fetale e modificazioni epigenetiche

Alla luce dell'esistenza dei processi epigenetici si iniziano a comprendere i meccanismi attraverso cui la disponibilità di nutrienti nell'ambiente prenatale si trasmette al feto inducendo un nuovo fenotipo.

Lo stadio di embriogenesi è un periodo cruciale in cui si stabilisce l'epigenotipo. Poiché i nutrienti sono necessari per il processo di metilazione, fattori quali la nutrizione in primis, ma anche l'esposizione a fumo, droghe, e glucocorticoidi possono alterare i patterns epigenetici. Queste alterazioni, se mantenute a lungo saranno in grado di influenzare l'espressione genica e causare modifiche nei tratti fenotipici. (95)

Sono diversi ormai gli studi che hanno investigato l'effetto della nutrizione materna durante la gravidanza o durante l'allattamento nell'espressione genica della prole nel modello animale, utilizzando un approccio genetico che ha permesso di identificare le basi molecolari per cui avvengono i cambiamenti nelle vie metaboliche ed endocrine.

(Figura 1)

E' indispensabile innanzitutto sottolineare che la metilazione del DNA è un processo fondamentale per il corretto sviluppo embrionale. A dimostrazione di ciò, Li e colleghi hanno introdotto delle cellule staminali mutate in omozigosi nella linea germinale delle loro cavie: gli embrioni hanno mostrato nel DNA una riduzione di tre volte del livello di citosine metilate che ne ha causato lo sviluppo anomalo nonché la morte precoce in epoca embrionale. (100)

Tale processo di metilazione dipende dalla disponibilità di donatori di gruppi metilici e cofattori che si assumono con l'alimentazione e che sono coinvolti nel metabolismo della metionina, amminoacido essenziale che dipende strettamente dal ciclo dei folati. (101)

Per questo l'acido folico si è dimostrato fondamentale per la completa maturazione (formazione, sviluppo e chiusura) del tubo neurale nell'uomo e viene dato come supplemento alle donne in gravidanza. (102)

Poiché è proprio durante l'embriogenesi che si stabilisce l'epigenotipo, se ne deduce che, una dieta povera o troppo ricca di donatori metilici e cofattori durante questo momento critico, può influenzare i patterns epigenetici. (103)

Sinclair e colleghi descrissero a questo proposito come, fin dal periodo periconcezionale, la riduzione materna di nutrienti coinvolti nel ciclo dei folati e della metionina, abbia un importante impatto nella progenie. Nei loro studi animali hanno sottoposto le cavie ad una dieta deficiente in cobalto e solfato a partire dalle 8 settimane prima della gravidanza fino a 6 giorni dopo il concepimento diminuendo in questo modo la capacità di sintetizzare amminoacidi solforati e vitamina B 12. Di conseguenza nel sangue periferico risultavano ridotte concentrazioni di vitamina B12, folati e metionina ed elevate concentrazioni di omocisteina nel fluido follicolare ovarico, plasma, granulosa. I maschi della progenie, ma non le femmine, mostravano a 22 mesi una maggior quantità di grassocorporeo e una minor massa muscolare, pressione sanguigna elevata e un'alterata metilazione a carico di ben 1400 'CpG islands' nel fegato fetale. (104)

Anche il deficit di altri nutrienti risulterebbe coinvolto in processi epigenetici. Una dieta ipoproteica indotta nelle topoline in gravidanza ha determinato nei loro piccoli, un aumento dell'espressione dei recettori per i glucocorticoidi insieme ad una diminuzione dell'espressione dell'enzima inattivante i corticosteroidi in diversi organi quali fegato, polmoni, rene e cervello. (105)

Nel fegato, l'aumentata attività dei recettori è in grado di up-regolare l'espressione e l'attività dell'enzima fosfoenolpiruvato carbossichinasi, incrementando l'attività di gluconeogenesi, che potrebbe contribuire all'induzione di insulino-resistenza. (106)

Un'alterata espressione dei recettori per i corticosteroidi è stata anche riportata nei

polmoni, fegato e ghiandole surrenali della prole di una pecora sottoposta a restrizione dietetica durante la gravidanza. Inoltre la restrizione materna di proteine durante la gravidanza o l'allattamento, altera l'espressione di geni coinvolti nella omeostasi lipidica. (107)

Weaver et al hanno dimostrato che i piccoli di ratto nati da madri ipoalimentate hanno una aumentata risposta allo stress. L'effetto sembra dovuto ad una ipermetilazione di specifici CpG dinucleotidi nel promotore del gene per i glucocorticoidi nell'ippocampo della prole. (108)

Altri hanno mostrato che la legatura dell'arteria uterina nel topo diminuisce l'espressione della p53 nel rene della prole che si associa ad una aumentata apoptosi e un ridotto numero di nefroni. (109)

Sembra chiaro quindi che la dieta materna abbia degli effetti di lunga durata nella espressione genica della progenie e potenzialmente sia in grado di determinare una suscettibilità a malattie complesse dell'età adulta. Gli studi sopracitati rivelano che il supporto di nutrienti in utero, può alterare il metabolismo dei gruppi metilici interferendo con il processo di metilazione del DNA e conseguentemente con l'espressione genica e lo sviluppo dell'intero organismo.

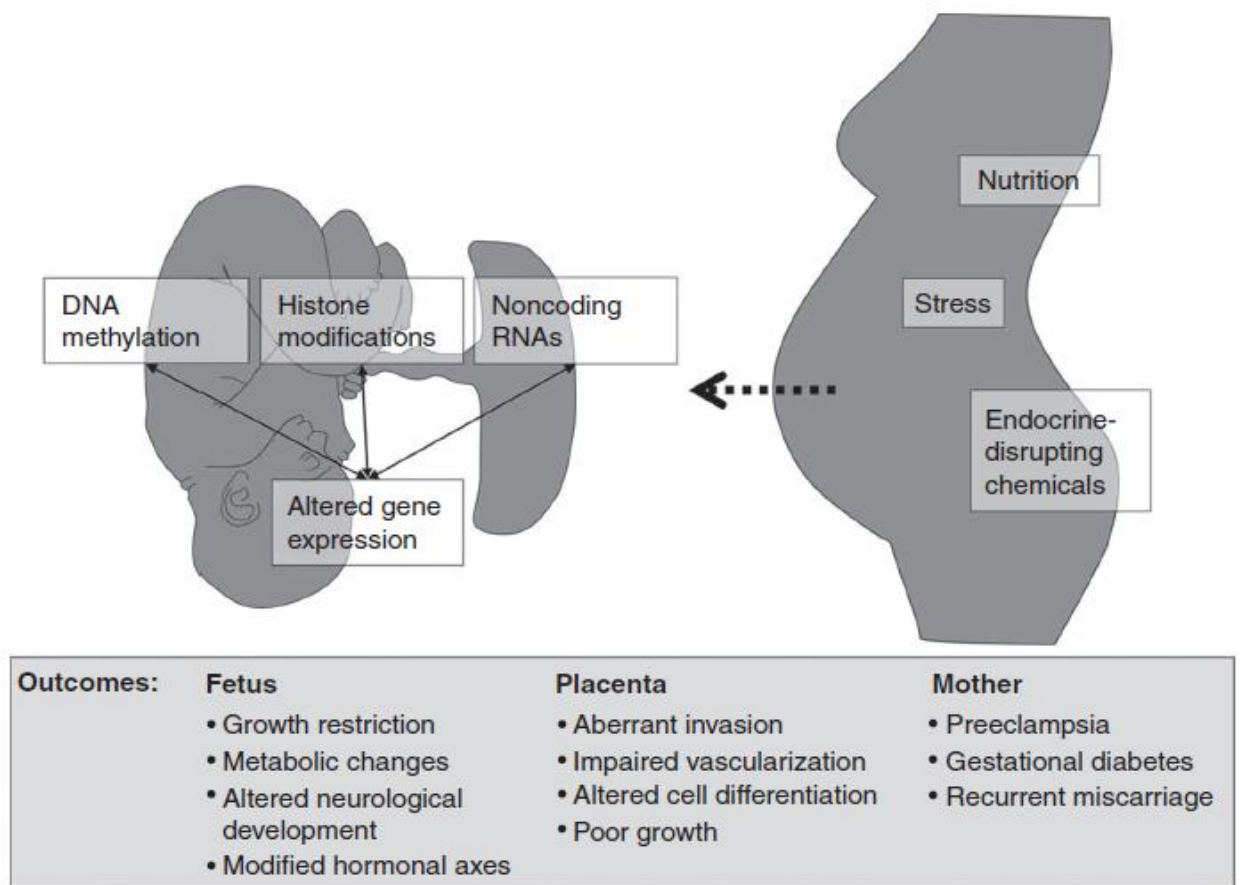


Figura 1: L' influenza epigenetica negli outcomes della gravidanza
 (Hogg K et al 2012, Clinical pharmacology & Therapeutics)

Un outcome materno sfavorevole può associarsi ad esposizioni ambientali quali nutrizione, stress, ed agenti chimici. Questi effetti sono mediati in parte da meccanismi epigenetici tra cui la metilazione del DNA e modificazioni istoniche.

‘Fetal programming’: l’immunità dal feto all’adulto

Il sistema immune che protegge l’ospite da vari patogeni, è costituito da un sistema innato (naturale e non specifico) e da un sistema acquisito (che si adatta ed è specifico), che alla nascita sono entrambi già presenti, ma sono ancora funzionalmente immaturi. (110)

Infatti una volta che il sistema è qualitativamente completo, sia il feto che il neonato necessitano di input continui dalla madre sotto forma di fattori immuni trasferiti prima attraverso la placenta e poi nel latte materno. Lo stato nutrizionale materno può essere in grado di incidere su entrambe queste vie. (111)

Nel feto, lo sviluppo di entrambi i tipi di sistemi immuni, dipende in gran parte da una adeguata disponibilità di macro e micronutrienti. Studi sperimentali ed epidemiologici provenienti sia da animali che da modelli umani suggeriscono che il deficit materno di energia, proteine, acidi grassi e micronutrienti durante la gestazione comprometta seriamente lo sviluppo del sistema immune fetale aumentando il rischio di infezioni nel corso dell’infanzia e di effetti a lungo termine anche nell’adulto. (112)

Lo sviluppo e la maturazione del sistema immune iniziano dunque molto presto durante stadi precoci di vita e continuano durante l’infanzia e la prima adolescenza. Vi è un periodo nel quale le cellule del sistema immune mostrano una maggior vulnerabilità e suscettibilità ad insulti ambientali, quali la malnutrizione e lo stress. Un precoce periodo-finestra si ha quando i tessuti vengono penetrati dai precursori delle cellule immuni ed esso è specifico per ogni cellula appartenente a questo sistema. (113)

Sebbene non esistano allo stato attuale grandi evidenze sull’influenza della nutrizione nel processo di linfopoiesi, alcuni ricercatori hanno recentemente osservato che il feto esposto a deficit di vitamina A può avere conseguenze sulle cellule progenitrici dando vita a popolazioni di linfociti B di dimensioni più piccole. (114)

Inoltre, gli organi linfoidei primari e secondari vanno incontro ad un rapido sviluppo durante l'ultimo periodo di gravidanza e nel primo periodo dopo la nascita. In virtù di questo, il timo è stato largamente studiato ed è ampio il consenso sulla particolare sensibilità dell'organo allo stato nutrizionale. (115)

Il timo compare precocemente in gravidanza, il suo periodo critico di sviluppo è intorno alla 7°-14° settimana di gravidanza e raggiunge la sua massima grandezza in base al peso corporeo al momento della nascita.

Si tratta inoltre di una ghiandola molto complessa, con una architettura compartimentalizzata ben definita in cui è necessario un coordinamento tra diverse linee cellulari tra cui i timociti, cellule stromali e linfociti T, coadiuvato da chemochine che fungono da segnali per il differenziamento. (116) Per cui sono molti i meccanismi o le cellule implicate con l'organo su cui uno stimolo può agire.

Questo organo linfoide è di grande importanza poiché è la sede di sviluppo e differenziamento delle cellule T. Inoltre è qui che avviene la selezione positiva e negativa (eliminazione dei cloni autoreattivi) dei linfociti T, meccanismo fondamentale per la tolleranza immunologica. (117)

Questo meccanismo di selezione timica a cui vanno incontro i linfociti avviene proprio intorno alla metà della gravidanza e questo è considerato un momento critico in cui la ghiandola è molto suscettibile e l'esposizione ad uno stato di malnutrizione potrebbe avere delle conseguenze particolarmente importanti. (118)

Il deficit proteico (119) ma anche quello di altri specifici nutrienti si associano ad atrofia timica. (120) Le alterazioni sembrano in parte mediate da concomitanti cambiamenti ormonali e sembrano essere reversibili. (121)

La dimostrazione di una relazione diretta tra crescita fetale inappropriata e dimensioni del timo viene da uno studio condotto su 60 neonati IUGR in cui, le dimensioni del timo alla nascita valutate all'ecografia sono risultate nettamente inferiori a quelle dei neonati a

termine. Nel loro lavoro gli autori speculano che uno stress nutrizionale, mediato dall'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene possa indurre l'involutione timica come una risposta adattativa per la sopravvivenza fetale. (122)

Tuttavia, successivamente, Jeppesen e colleghi hanno seguito le fasi di crescita del timo in un gruppo di 80 prematuri (24-36 settimane), valutandone ecograficamente le dimensioni in momenti diversi. Nonostante alla nascita il timo di questi neonati risultava più piccolo della controparte a termine, la crescita postnatale della ghiandola continuava il suo normale decorso a dimostrazione che la nascita pretermine non compromette lo sviluppo postnatale del timo. L'ipotesi è che questa 'crescita eccellente' potrebbe essere influenzata dalle elevate quantità di latte artificiale con cui i neonati pretermine vengono nutriti. (123)

Ancora più di recente, Olearo e colleghi hanno riscontrato un minor volume del timo fetale in quei feti IUGR con alterazioni nella velocimetria dell'arteria ombelicale, piuttosto che negli SGA costituzionali e negli IUGR simmetrici con flusso ombelicale nella norma, suggerendo la possibilità che vi sia stato, nel primo gruppo di neonati, un fattore scatenante capace di compromettere lo sviluppo timico. (124)

La relativa monocitopenia e neutropenia dei neonati pretermine se confrontati con quelli a termine ne compromette la capacità di rispondere alle infezioni. (125)

I monociti nel pretermine inoltre, producono minori quantità di citochine, seppure dimostrino una efficacia simile nella fagocitosi e nell'uccisione intracellulare a quella dei neonati a termine. (126)

In Scandinavia, alcuni ricercatori, hanno notato una più frequente ospedalizzazione per infezioni nell'infanzia e una maggior mortalità intorno ai 15 anni tra i ragazzi nati di basso peso, indipendentemente dall'età gestazionale. (127)

I neonati pretermine SGA sono maggiormente predisposti ad infezioni postnatali rispetto ai controlli con la stessa età gestazionale ma con crescita adeguata (AGA). Infatti,

sebbene le differenze del sistema immune negli SGA siano ancora poco conosciute, questi neonati dimostrano avere un minor numero di cellule NK (128), di linfociti B, diminuzione del numero totale di linfociti T, con maggior deficit di linfociti T helper, ma non di linfociti T citotossici rispetto ai neonati AGA a tutte le età gestazionali. Questa immaturità del sistema immune ne condiziona la suscettibilità alle infezioni: quando stimolati dal virus dell'influenza, le cellule T hanno delle risposte antivirali più deboli e ritardate. (129)

Anche Wirbelauer e collaboratori hanno dimostrato in un gruppo di neonati SGA con età gestazionale <32 settimane, una conta più bassa di leucociti, neutrofili, neutrofili immaturi, linfociti e monociti giungendo alla conclusione che lo stato di IUGR è un fattore di rischio indipendente per una conta più bassa di queste popolazioni cellulari subito dopo la nascita. (130)

Una corte inglese di 305 donne di Hertfordshire tra i 60-70 anni è stata sottoposta ad uno studio che ne ha valutato le caratteristiche perinatali quali il peso alla nascita, la crescita nell'infanzia, e l'allattamento. Sviluppavano autoanticorpi contro la tiroide le donne che avevano dimostrato un peso alla nascita inferiore di coloro che non ne sviluppavano. (131)

Che l'ipotiroidismo possa essere incluso tra quei disordini che iniziano già in utero, lo dimostra un altro studio in cui le donne ipotiroidee risultano nate di basso peso e di lunghezza ridotta, mostrano un BMI inferiore nella tarda adolescenza e raggiungono un'altezza minore nella età adulta. (132)

Come già descritto, le evidenze suggeriscono che non solo un basso peso alla nascita può essere l'espressione di un ambiente fetale avverso, ma anche un alto peso alla nascita può rappresentare un fenotipo sfavorevole. A testimonianza di ciò, è doveroso citare alcuni studi condotti su alcune tra le principali malattie reumatologiche autoimmuni che hanno

trovato correlazione con questa condizione. Un peso maggiore di 4000 g è risultato associarsi positivamente con lo sviluppo di artrite reumatoide. (133)

Il risultato è stato confermato da un ampio studio prospettico abbastanza recente, il 'Nurses Health Study', coinvolgente 121700 donne tra i 30 e i 55 anni che ha messo in luce come un peso alla nascita > 4.54 Kg comporti un rischio doppio di sviluppare artrite reumatoide rispetto ad un peso nel range della normalità. (134)

Tuttavia non concorda con questi risultati la ricerca di Parks e colleghi che ha invece trovato correlazione tra il basso peso alla nascita (<2500 g) e l'effetto del fumo paterno in epoca preconcezionale con lo sviluppo di artrite reumatoide. (135)

Un alto peso alla nascita, oltre ad una giovane età materna, sembrano favorire lo sviluppo della sindrome di Sjögren, a testimoniare un' influenza dell'ambiente perinatale nel determinismo di questa malattia. (136)

Mentre Coleman e i suoi ricercatori, nel testare l'ipotesi del 'fetal programming' nello sviluppo del LES, sono giunti alla conclusione che né il peso, né la lunghezza alla nascita si associano con il successivo sviluppo di malattia (137), Simard e colleghi hanno dimostrato che sia la nascita pretermine (più di due settimane) che un alto peso alla nascita, comportavano un rischio doppio di sviluppare la patologia, al contrario del basso peso alla nascita e dell'allattamento materno i cui effetti non hanno dato evidenza statistica. (138)

Vie di programmazione del sistema immune

E' ormai pienamente accettata l'idea che il sistema immune come altri si sviluppi in più fasi, ma che l'ontogenesi delle prime linee di difesa avvenga nei primi momenti di vita per cui è molto plausibile che insulti nutrizionali durante questo periodo possano alterare permanentemente specifiche popolazioni cellulari o la formazione di alcuni organi coinvolti in tale sistema con un impatto notevole sulla regolazione dei suoi meccanismi protettivi.

Gli studiosi ritengono che le principali vie attraverso cui la malnutrizione in utero può influenzare lo sviluppo del sistema immunitario siano le seguenti (111) (Figura 4):

- 1-Alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene
- 2-Limitata disponibilità di nutrienti per lo sviluppo embrionale e fetale
- 3-Alterazioni nel trasferimento dell'immunità dalla madre al bambino

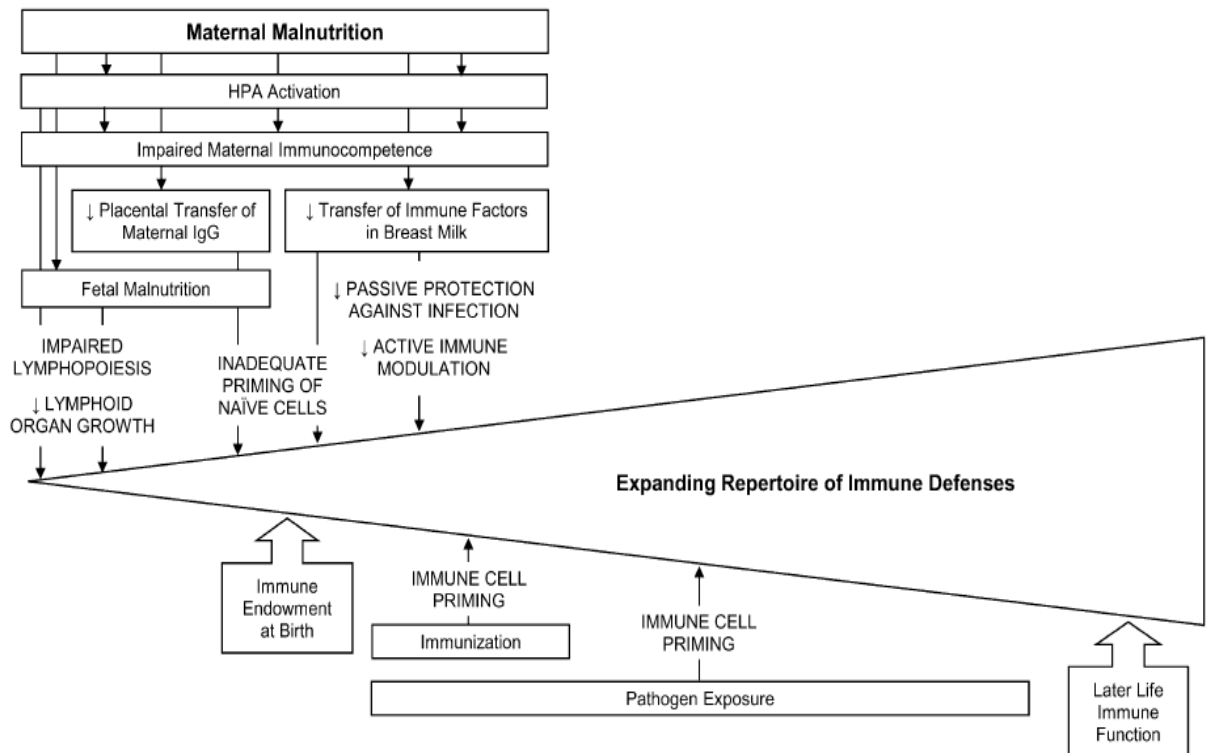


Figura 4: Possibili associazioni tra la nutrizione materna e il sistema immunitario

(Palmer AC2011; Advances in Nutrition)

Alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene

L'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandole surrenali (hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA), rappresenta la principale via neuroendocrina in grado di modulare la risposta allo stress.

La malnutrizione viene percepita dall'organismo come un evento stressante, che ne altera l'omeostasi, e porta quindi alla attivazione dell'asse aumentando i livelli circolanti di glucocorticoidi che possono agire direttamente sul sistema immunitario e indurre modificazioni.

I glucocorticoidi che raggiungono il feto derivano da tre possibili risorse: a) ex novo dal feto stesso per aumento della secrezione basale da parte delle ghiandole mature o per incremento della produzione in risposta ad uno stimolo stressante, b) dalla madre attraverso la placenta, c) da produzione locale da parte dei trofoblasti corionici e l'epitelio

amniotico. La loro disponibilità è regolata dall'enzima placentare beta-idrossisteroide deidrogenasi: in condizioni di malnutrizione, l'attività di questo enzima si riduce e aumenta la quantità di glucocorticoidi che raggiunge il compartimento fetale con effetti deleteri per il suo sviluppo. (139)

Poiché capace di indurre vasodilatazione, un aumento del cortisolo materno potrebbe essere responsabile di un'alterazione del flusso locale di sangue, diminuendone la quantità che raggiunge il feto e peggiorando l'uptake di glucosio da parte della placenta. In questo senso il cortisolo in eccesso potrebbe agire da 'meccanismo ad orologeria' dando il via agli eventi precoci che conducono al parto, ed essere responsabile della nascita prematura, nonché del neonato con basso peso. (140)

In merito al sistema immune, l'esposizione precoce ad elevate quantità di glucocorticoidi ha dimostrato ridurre il peso del timo oltre a ridurre il numero di linfociti nella zona corticale e questi cambiamenti sembrano mediati da una endonucleasi endogena che induce morte per apoptosi delle cellule timiche. (141)

L'attivazione precoce dell'asse comporta alterazioni neuroendocrine nell'organismo a lungo termine che interessano la produzione di anticorpi, la reattività delle cellule NK, la proliferazione linfocitaria, persino la percezione del dolore che può permanere alterata per tutta la vita. (111)

Alcuni studiosi suggeriscono pertanto che, un potente stimolo stressante durante la vita fetale possa funzionare da 'trigger' inducendo modificazioni epigenetiche a carico dei recettori dei glucocorticoidi che sono responsabili di una alterazione del 'set point' dell'asse con sua iperattivazione in epoche successive. A testimonianza dell'effetto di lunga durata, un'alterata attività dell'asse nell'infanzia e nell'età adulta si associa ad un più basso peso alla nascita. (142)

Cotrell e collaboratori hanno dimostrato che una dieta materna a basso intake proteico, causa prima restrizione placentare e poi rallentamento della crescita fetale con una

precoce attivazione dell'asse concordando che il feto risponde precocemente e attivamente ad alterazioni della nutrizione. (143)

In adulti nati da madri con malnutrizione materna, metilazioni del DNA sono state riscontrate a carico di geni implicati nel controllo dei livelli circolanti di cortisolo e della sua azione sui tessuti, oltre che nel controllo della pressione arteriosa; alterazioni queste, che comportavano un aumento del rischio cardiometabolico in questi soggetti. (144)

Limitata disponibilità di nutrienti

Carenze nutrizionali possono infierire sull'ontogenesi del sistema immune indipendentemente dall'attivazione dell'asse. Deficit di zinco anche lievi, possono diminuire le dimensioni del timo, la concentrazione di anticorpi e peggiorare l'attività dei linfociti. Esperimenti su animali surrenectomizzati hanno mostrato che questi effetti sono determinati da vie alternative a quella dei glucocorticoidi. (145)

Anche in questo caso i meccanismi epigenetici possono influenzare il sistema immune in via di sviluppo come stabilito per alcune forme di atopia, asma, e alcune malattie autoimmuni: in cavie sottoposte a dieta metilata, la ipermetilazione del DNA, ha infierito sull'espressione di geni di linfociti T e sul loro sviluppo. (146)

Per ciò che riguarda specifici nutrienti, sembra che un deficit materno di cobalamina si associ ad alterazioni istologiche del piccolo intestino e ridotti valori ematici di IgA sia nelle madri che nella progenie di modelli animali. (147)

Inoltre il deficit di folati è stato associato a diverse malattie caratterizzate da aumentate risposte non allergiche di tipo Th1 e ipersensibilità ad atopia/ allergia. Per contro, uno studio molto ampio, dalla Norvegia, ha mostrato che proprio la supplementazione di acido folico nel primo trimestre di gravidanza aumenta l'incidenza di wheezing e di infezioni delle basse vie respiratorie dopo i 18 mesi di vita. (148)

Alterazioni nel trasferimento utero-placentare di fattori immuni

Fattori immunitari di origine materna, trasferiti al bambino attraverso la placenta o il latte materno possono modulare attivamente lo sviluppo del sistema immune, per cui qualsiasi noxa che interferisca con tale trasferimento può alterare la traiettoria dell'immunità del neonato.

La malnutrizione, ostacolando la placentazione, riduce il supporto di nutrienti, ormoni e fattori immuni al feto e va ad interferire sia con la qualità che con la quantità dei fattori immunitari trasmessi normalmente durante la gravidanza; se si protrae anche dopo la nascita interferisce con le funzioni del bambino attraverso il latte materno. (111)

La malnutrizione materna può compromettere lo sviluppo placentare per deficit vascolare con alterazioni di sistemi di trasporto .

Nella gravidanza di donne sane, le IgG sono attivamente ed efficacemente trasportate attraverso la placenta al feto e permangono nel neonato fino a circa 3-6 mesi di vita; tale passaggio avviene per la maggior parte nelle ultime 4-6 settimane di gestazione, per cui è plausibile che la nascita pretermine possa di per sé essere una causa di deficit di IgG nella prima infanzia.

Ridotti livelli di IgG sono stati osservati anche in neonati SGA e in quelli nati da madri con un peso più basso della media. (149)

Cavalcante e colleghi nel valutare la risposta alla vaccinazione contro l'*Haemophilus influenzae* tipo b in donne in gravidanza, hanno riportato una riduzione del trasporto di anticorpi materno-fetali di circa il 14% tra le donne che iniziavano la gravidanza con un basso peso rispetto a quelle di peso normale, nonostante la produzione di anticorpi fosse stata molto simile in entrambe. (150)

L'epigenetica nelle malattie autoimmuni. Nuove evidenze

Le malattie autoimmuni rappresentano il classico esempio di patologie multigeniche e sono numerosi gli studi che ne hanno identificato le associazioni con specifici geni. Gli studi sono concordi nel sostenere l'importanza dei fattori genetici, riconoscendo che i pazienti con malattie autoimmuni hanno per natura genetica, un sistema immune predisposto ad una responsività aberrante ma si ormai è arrivati a comprendere che lo sviluppo di queste malattie è mediato dall'esposizione ambientale ad un fattore scatenante ('trigger').

Mentre alcuni di questi fattori sono stati identificati e correlati con specifiche malattie, altri sono solo stati ipotizzati e non ancora dimostrati; per la maggior parte in realtà devono essere identificati.

I 'triggers' ambientali che giocano un ruolo nella patogenesi delle malattie autoimmuni comprendono tutti quei fattori che sono in grado di modulare la risposta immune quali agenti infettivi, raggi ultravioletti, composti chimici, droghe, fumo, fattori alimentari.

(62) **(Figura 1)**

Poiché i meccanismi epigenetici sono sensibili agli stimoli esterni è plausibile che anche il sistema immune possa rispondere alterazioni epigenetiche ad insulti ambientali.

Solo di recente l'epigenetica si è proposta anche come affascinante nuova area di studio nella suscettibilità alla patologia immunomediata.

Le prime evidenze di una possibile correlazione tra epigenetica e autoimmunità sono arrivate dagli studi condotti su gemelli monozigoti (MZ) che mostrano che, tipicamente le malattie autoimmuni hanno una penetranza pari solo al 20-30%, suggerendo che una sequenza nucleotidica da sola non possa essere sufficiente per lo sviluppo della malattia.

(151)

Quando gemelli MZ, discordanti all'inizio per diabete mellito tipo 1 sono stati seguiti nel corso degli anni, la percentuale di gemelli sani che sviluppava successivamente la malattia cresceva lentamente fino all'età di 40 anni, ma poi raggiungeva percentuali del 25% a 40 anni e fino al 60% all'età di 60. Questo portò alla considerazione che, durante queste cinque o sei decadi di vita, cambiamenti esterni e/o interni, annullavano l'effetto protettivo che aveva evitato lo sviluppo della malattia nel gemello sano fino a quel momento. In questo modello, gli effetti epigenetici si dimostravano in grado di modificare la penetranza della malattia autoimmune. (152)

Nella malattia autoimmune sono due i protagonisti principali : il sistema immune che è il responsabile del danno autoimmune e l'organo bersaglio, che può avere una resistenza variabile al danno autoimmune. Le modificazioni epigenetiche sia a carico del sistema immune che dell'organo bersaglio possono avere un ruolo nello sviluppo della patologia. Di recente, diversi studi indicano che vi è un controllo epigenetico delle cellule coinvolte nelle più importanti funzioni immunitarie. (62)

Ad esempio processi epigenetici sono responsabili della differenziazione di linfociti T helper e della stabilità della loro linea difensiva e meccanismi epigenetici controllano anche la produzione di anticorpi da parte delle cellule B. (153)

La tolleranza nei confronti di specifici auto antigeni viene regolata da una 'proteina regolatrice autoimmune' chiamata AIRE, che promuove l'espressione di antigeni tessuto-specifici nelle cellule epiteliali della sostanza midollare del timo. AIRE è costituita di alcune propaggini (PHD) che si legano ad un istone metilato H3 : il modello animale ha rivelato che una mutazione all'interno di una di queste propaggini PHD, comportando un diminuito legame tra AIRE e l'istone H3, determina una diminuita trascrizione della proteina e favorisce lo sviluppo di autoimmunità.

Anche cambiamenti a carico degli organi bersaglio possono diminuirne la resistenza e giocare un ruolo altrettanto importante nello sviluppo della patologia autoimmune come dimostrato da diverse evidenze degli ultimi anni. (62)

Ciò che non è ancora chiaro è se entrambi i cambiamenti (nel sistema immune e nell'organo bersaglio) siano necessari per lo sviluppo della malattia autoimmune, o se i cambiamenti avvengano nelle diverse patologie in uno solo dei due compartimenti o se il tipo di malattia autoimmune (organica vs sistemica) correli maggiormente con cambiamenti epigenetici nell'organo bersaglio piuttosto che nel sistema immune.

Per esempio, nei tessuti sinoviali di pazienti con artrite reumatoide è stata riscontrata una ipometilazione del DNA. (154)

Allo stesso modo in pazienti affetti da sclerosi multipla, rispetto ai pazienti di controllo, è stata descritta una ipometilazione del DNA nella sostanza bianca del tessuto centrale, ma non nel timo evidenziando che anche unicamente l'organo bersaglio può mostrare cambiamenti epigenetici. (155)

Le ricerche più innovative hanno tra l'altro dimostrato che modificazioni a carico del DNA e degli istoni nelle cellule possono entrambe alterare il loro status antigenico. Ne sono un esempio gli studi condotti sul LES che hanno evidenziato che gli autoanticorpi caratteristici di questa malattia, anticorpi antinucleari (ANA), hanno come bersaglio cellule localizzate nel nucleo che contengono DNA ipometilato e modificazioni a carico degli istoni a dimostrazione che anche nel LES meccanismi epigenetici sembrano coinvolgere le cellule degli organi bersaglio. (156)

Con l'epigenetica si è anche tentato di dare risposta alla suscettibilità di genere che si evidenzia nei confronti di alcune malattie autoimmuni: stimoli differenti possono incidere in maniera diversa su maschi e femmine, con predilezione di un sesso piuttosto che un altro. Per spiegare questo dimorfismo sessuale nell'autoimmunità si può infatti supporre che individui di un determinato genere (maschile o femminile), si imbattano più

facilmente in fattori epigenetici rispetto alla controparte o che i membri di un determinato genere siano più vulnerabili di quelli appartenenti all'altro. Sebbene queste teorie siano solo al momento frutto di speculazioni, rappresentano una ipotesi attraente alla luce del costante aumento delle malattie autoimmuni nelle giovani femmine, ma non nei maschi, durante gli ultimi 100 anni; anni durante i quali sono avvenuti i maggiori cambiamenti sociali della storia che hanno interessato il sesso femminile. (157)

Si ritiene che l'epidemiologia di diverse malattie autoimmuni possa essere spiegata in base a modificazioni epigenetiche che indotte dalla nutrizione, inducano un mancato riconoscimento del self, ma al momento non vi sono studi randomizzati che ne diano dimostrazione. Tuttavia sembra che l'obesità possa predisporre all'insorgenza di alcune forme di malattia autoimmune. Nella sclerosi multipla ad esempio, sia l'obesità che il diabete materno o l'obesità in epoca adolescenziale possono predisporre all'insorgenza successiva della malattia; aumentati livelli di lipidi si associano ad outcomes peggiori (158,159) e aumentati livelli di leptina correlano con un minor numero di cellule T regolatrici (regulatory T cells: Tregs) in pazienti con sclerosi multipla. (160)

Una recente studio proveniente dal Minnesota, ha dimostrato nella propria corte di 813 pazienti affetti da artrite reumatoide, una maggiore incidenza di obesità rispetto alla popolazione di controllo, giungendo alla conclusione che l'obesità contribuisce ad un aumento del rischio, seppur modesto, di tale malattia.

Uno dei possibili meccanismi patogenetici postulato dagli autori è quello per cui l'obesità si associa ad uno stato di infiammazione cronico poiché gli adipociti producono citochine infiammatorie tra cui adiponectina, leptina e TNF, interleuchina-6, proteina C reattiva ed altre. (161) Le principali adipocitochine possiedono delle proprietà immunomodulanti e proprietà infiammatorie ed entrambe sono implicate nella fisiopatologia dell'artrite reumatoide. (162)

Sulla stessa scia è stato osservato che i pazienti con LES obesi hanno dei livelli circolanti di TNF- α maggiori dei pazienti affetti da LES non obesi o dei pazienti sani, suggerendo che la massa grassa potrebbe contribuire ad aumentare i livelli di TNF- α nei pazienti con LES. (163)

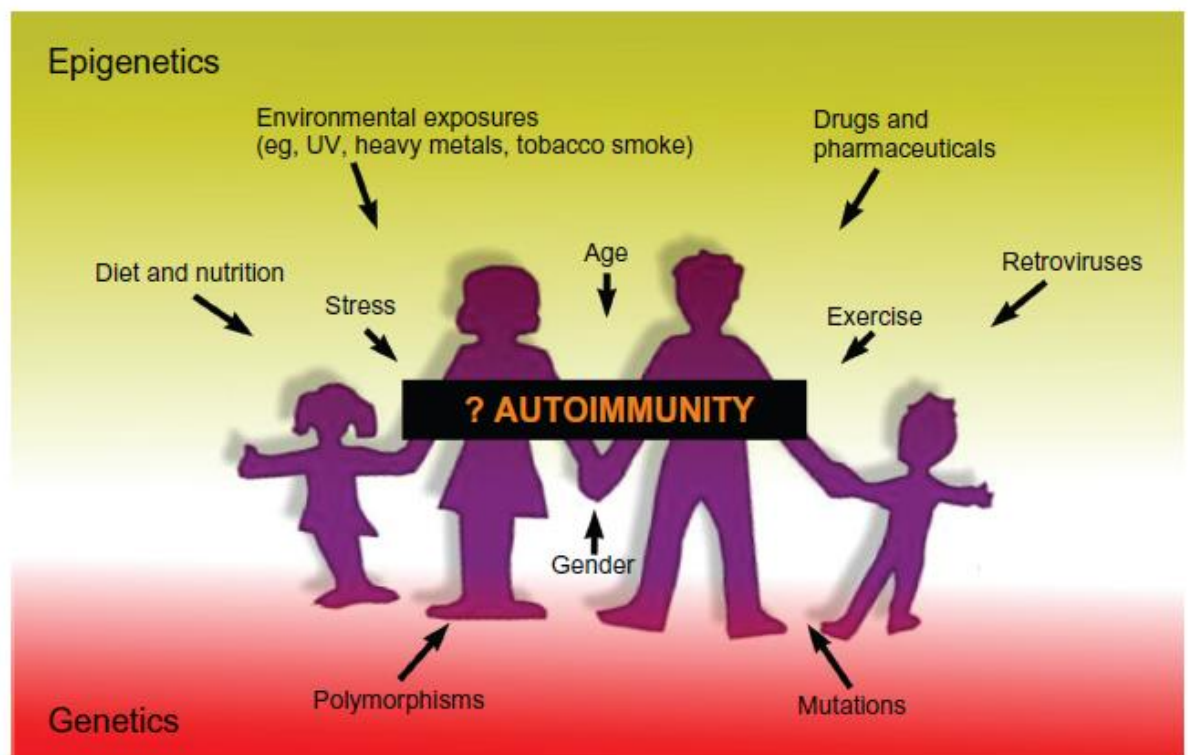


Figura 1. Fattori che possono portare allo sviluppo di autoimmunità
(Greer J M et al 2012; Biologics: Targets and Therapy)

‘Fetal programming’ e patologie reumatiche autoimmuni: il caso della sclerosi sistemica

Descrizione del progetto di ricerca

Introduzione

Lo studio si inserisce nel panorama dell’‘early life programming’ di fronte alle evidenze che anche il sistema immune presenta grande plasticità durante lo sviluppo per cui è possibile che già in utero subisca una programmazione di molte sue funzioni.

Il peso alla nascita, la condizione di restrizione fetale (IUGR) e la condizione di piccolo per l’età gestazionale (SGA) sono stati presi in considerazione in diversi studi come prototipi di un ambiente fetale avverso per cercare di individuare una possibile correlazione tra queste condizioni e lo sviluppo di malattie legate al sistema immune.

Il lavoro nasce dalla collaborazione di clinici neonatologi e reumatologi nella convinzione comune che anche per le patologie autoimmuni possa essere un valido aiuto, per comprenderne le origini nonché i meccanismi patogenetici, studiare momenti che, se pur lontani dalla comparsa della malattia, possono averne gettato le basi.

La scelta della sclerosi sistemica come prototipo di malattia reumatologica che possa correlarsi con insulti all’origine della vita, si spiega di fronte alle poche conoscenze che si hanno ancora oggi sulla sua eziopatogenesi. La possibilità di effettuare uno studio multicentrico ed ottenere così una larga corte di pazienti, ne ha avvalorato la scelta.

L’approccio epidemiologico della ricerca ha voluto innanzitutto dare spazio ad elementi anamnestici comuni a quelli con cui sono stati effettuati numerosissimi studi sul ‘fetal programming’.

L'approccio di laboratorio che si è avvalso della metabolomica, ha permesso, usando una tecnica non invasiva, di fare un passo in avanti nella caratterizzazione del fenotipo della SSc.

La Sclerosi Sistemica: caratteristiche generali

La sclerosi sistemica (SSc) o sclerodermia, è una malattia reumatologica multisistemica e cronica, ad eziologia sconosciuta le cui principali caratteristiche sono: la vasculopatia dei piccoli vasi, la produzione di autoanticorpi e la disfunzione dei fibroblasti che porta ad un aumentata deposizione di matrice extracellulare. (164)

Si tratta di una delle malattie del connettivo più invalidanti e a peggior prognosi, che compromette la qualità di vita dei soggetti colpiti e può condurre a morte.

La malattia si presenta con una prevalenza tra i 50-300 casi /1.000.000 di abitanti e una incidenza di 2.3-22.8 casi/1.000.000 di soggetti all'anno.

La probabilità di comparsa della SSc tende ad aumentare con l'età, con un picco massimo tra la terza e quinta decade di vita. (165)

Le donne hanno un rischio maggiore degli uomini di essere colpite dalla malattia, con un rapporto donne/ uomini che varia da 3:1 a 14:1. (166)

Sebbene la malattia sia ubiquitaria, ricerche epidemiologiche indicano che, sia la prevalenza che l'incidenza della SSc sembrano essere maggiori nelle ancestrali popolazioni di origine europea che nei gruppi asiatici, e si ha una maggiore, seppur lieve, prevalenza tra soggetti di razza nera. (167)

La comparsa della malattia in più soggetti di uno stesso nucleo familiare, l'alta frequenza di altre patologie autoimmuni nelle famiglie di pazienti sclerodermici e le differenze fenotipiche tra le varie razze ed etnie, suggeriscono che fattori genetici contribuiscono allo sviluppo della patologia.

In associazione con la SSc sono stati descritti diversi polimorfismi a carico di geni codificanti per citochine, recettori per le citochine e proteine extracellulari. (168)

L'elemento caratterizzante di questa malattia è il progressivo ispessimento e indurimento della cute e del tessuto connettivo sottocutaneo la cui estensione consente di distinguere una forma limitata (lcSSc) che rappresenta circa il 60% dei casi ed interessa le regioni distali dei quattro arti, una forma diffusa (dcSSc) che interessa anche le regioni prossimali degli arti ed il tronco e una forma senza interessamento cutaneo o 'sine scleroderma'. (164)

La forma limitata ha un coinvolgimento viscerale tardivo rispetto a quello cutaneo, mentre nella forma diffusa l'evoluzione è molto più rapida e l'interessamento degli organi e apparati si ha entro i primi cinque anni di esordio della malattia.

Il danno vascolare è un evento precoce nella sclerodermia che precede la fibrosi e interessa i piccoli vasi, particolarmente le arteriole.

La fibrosi cutanea gradualmente segue la fase infiammatoria della sclerodermia e in ultimo distrugge l'architettura del tessuto colpito ed è la causa della maggior parte dei sintomi della malattia. Il processo inizia nello strato più profondo del derma e risale nello strato sottocutaneo determinando perdita della microvascolatura, riduzione degli annessi cutanei, perdita della struttura reticolare e delle creste papillari.

La composizione della matrice varia con lo stadio della malattia: negli stadi iniziali è costituita da diversi tipi di collagene, proteoglicani, fibre elastiche tra cui fibrillina, mentre negli stadi più tardivi è costituita prevalentemente di collagene tipo I. (169)

L'immunità cellulomediata gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo della fibrosi avendo probabilmente come bersaglio l'endotelio vascolare.

E' tipico infatti della malattia l'aumento dei linfociti T CD4+, CD8+ e di un loro prodotto, l'interleuchina IL-2, che si associa a fibrosi in fase attiva. (164)

Di recente i criteri classificativi dell'American College of Rheumatology stilati nel 1980 e ritenuti tuttora validi da alcuni studiosi, (170) sono stati rivisti dall' American College of Rheumatology/European League, poiché ritenuti privi di sensibilità specialmente nei pazienti con la forma precoce di SSc e in quelli con la forma limitata cutanea. (171)

(Tabella 1)

Tra le manifestazioni cliniche dell'esordio, tipico è il fenomeno di Raynaud, **(Figura 1)** una vasocostrizione episodica delle estremità che può comparire in risposta all'esposizione al freddo o a stress emotivi ed è l'espressione clinica di un danno microvascolare che determina un'alterata regolazione del flusso sanguigno. E' di solito il primo segno della malattia e precede anche di molto il coinvolgimento organico, ma pur essendo la manifestazione clinica più frequente (interessa il 95% dei pazienti), non è specifico della malattia potendo comparire in forma isolata o in associazione ad altre malattie del connettivo. (172)

Il danno vascolare può essere osservato nel letto ungueale tramite la videocapillaroscopia che dimostra scomparsa del microcircolo, con dilatazione e tortuosità dei capillari superstiti.

Anche se l'esatto meccanismo di danno vascolare primitivo che scatena il fenomeno di Raynaud non sia ancora noto, si suppone che anticorpi antiendotelio, citotossicità immunomediata e meccanismi di ischemia-riperfusione siano implicati nella patogenesi. Nella cute l'epidermide appare assottigliata, gli annessi sono atrofici e il derma profondo è invaso da cellule T, monociti e plasmacellule. La cute diviene gradualmente rigida e ispessita. Sui polpastrelli delle dita possono insorgere ulcerazioni che vanno in contro ad infezioni e deformità : sclerodattilia. (173) **(Figura 2-3)**

A livello gastrointestinale l'esofago distale è la parte più colpita e viene interessato dalla fibrosi anche se in minor intensità rispetto alla cute, ma alterazioni simili si osservano

lungo tutto il tubo digerente. L'esofago distale si dilata e vi si può associare dolore urente, reflusso gastroesofageo e lo sviluppo di esofago di Barret. (174)

Il polmone viene interessato da fibrosi polmonare diffusa con ispessimento della membrana alveolare e fibrosi peribronchiale, l'intima delle piccole arterie polmonari e arteriole si ispessisce e determina ipertensione polmonare e l'insorgenza di dispnea. Il coinvolgimento polmonare interessa i 2/3 dei pazienti e quando si sviluppa ipertensione polmonare la prognosi è molto grave. **(Figura 4)**

Più della metà dei pazienti inoltre presenta interessamento renale con alterazioni simili a quelle dell'ipertensione maligna. L'insufficienza renale è una delle principali cause di morte: si manifesta con ipertensione arteriosa, ma a volte si presenta in maniera insidiosa nella fase tardiva della malattia.

Anche il cuore può essere interessato con pericardite e scompenso cardiaco in cui il danno alle miofibrille si pensa sia causato da uno spasmo intermittente dei vasi coronarici. A livello dell'apparato locomotore, la malattia si caratterizza per la comparsa di poliartralgie piuttosto che di artriti erosive franche come quelle che si osservano nell'artrite reumatoide. La sinovia dei tendini può essere interessata e determinare sindromi da intrappolamento quali la sindrome del tunnel carpale. (164)

Le articolazioni hanno mobilità limitata e la muscolatura risulta diffusamente atrofica.

Il 95 % dei pazienti presenta anticorpi antinucleo (ANA) e tra questi gli antitopoisomerasi I (anti-Scl-70) e gli anticentromero (ACA) sono specifici per la SSc. Questi anticorpi sono di grande utilità nella diagnosi e classificazione della malattia e vengono ampiamente utilizzati nella pratica clinica. (175)

Le manifestazioni cliniche così aggressive pongono la SSc come una tra le malattie reumatiche con maggior tasso di mortalità: l'aspettativa di vita media è compresa tra 16 e 34 anni. I fattori di rischio più importanti per la mortalità nella sclerodermia sono: la

forma con coinvolgimento cutaneo molto esteso, il coinvolgimento cardiopolmonare, il coinvolgimento renale e la presenza di anticorpi anti- topoisomerasi I. (176)

Inoltre diversi studi hanno descritto una maggior mortalità del sesso maschile associata alla patologia. (177)

Tabella 1: Criteri di Classificazione per la Sclerosi Sistemica (SSc) dell' American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism* (van den Hoogen F et al 2013; Arthritis & Rheumatism. Modificato)

Criteri maggiori	Criteri minori	Punteggio / Score †
Ispessimento della pelle delle dita di entrambe le mani che si estende in maniera prossimale alle articolazioni metacarpi (<i>criterio sufficiente</i>)	–	9
Ispessimento della cute delle dita (<i>considerare solo il punteggio più alto</i>)	Dita gonfie Sclerodattilia delle dita (distale alle articolazioni metacarpi ma prossimale alle articolazioni interfalangee prossimali)	2 4
Lesioni punta delle dita (<i>considerare solo il punteggio più alto</i>)	Ulcere delle punta delle dita 2 Cicatrici ruvide delle punta delle dita	2 3
Teleangectasia	–	2
Anomalie dei capillari ungueali	–	2
Ipertensione arteriosa polmonare e/o malattia polmonare interstiziale (<i>punteggio massimo: 2</i>)	Ipertensione arteriosa polmonare 2 Malattia polmonare interstiziale 2	2 2
Fenomeno di Raynaud		3
Autoanticorpi SSc-correlati (anticentromero, anti-topoisomerasi I[anti-Scl-70], anti-RNA polimerasiIII) (<i>punteggio massimo: 3</i>)	Anticentromero Anti-topoisomerasi I Anti-RNA polimerasi III	3

*Questi criteri sono applicabili a tutti i pazienti considerati per l'inclusione in uno studio sulla SSc. I criteri non sono applicabili ai pazienti con ispessimento della cute che risparmia le dita o ai pazienti che hanno una malattia simil-sclerodermica che spiega meglio le loro manifestazioni (ad esempio, fibrosi nefrogenica sclerosante, morfea generalizzata, fascite eosinofila, scleredema diabeticorum, scleromixedema, eritromialgia, porfiria, lichen sclerosus, malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), cheiroartropatiadiabetica).

†Il punteggio totale è determinato sommando il punteggio maggiore (score) in ogni categoria. I pazienti con un punteggio totale ≥ 9 sono classificati come affetti da SSc definita.



Figura 1. Fenomeno di Raynaud



Figura 2. Sclerodattilia

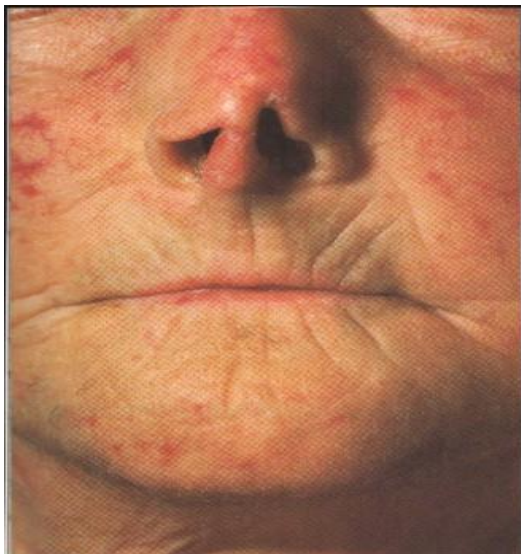


Figura 3. Facies paziente affetta da SSc

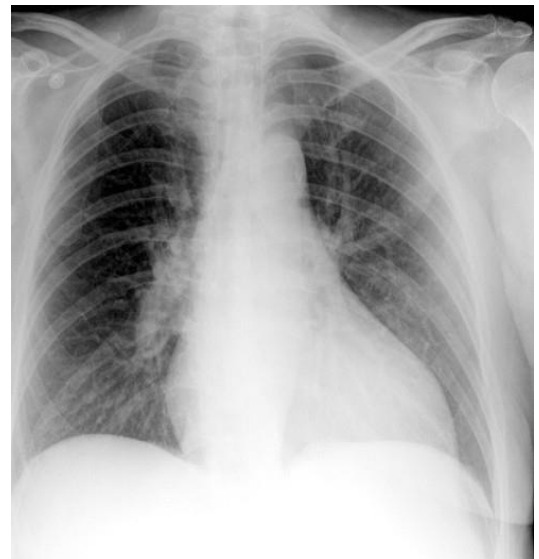


Figura 4. Ipertensione polmonare

Eziopatogenesi

Tra genetica ed epigenetica: l'importanza dei fattori ambientali

Nonostante i numerosi studi in questo campo, la SSc rimane ancora una patologia ad eziologia sconosciuta e gli autori sono concordi nell'affermare che la sclerodermia non è una malattia ben definita piuttosto una sindrome che presenta diversi fenotipi.

La difficoltà di esplicitare con chiarezza la patogenesi della malattia dipende dal fatto che al momento non è chiaro quale dei meccanismi patogenetici sia di importanza primaria nella SSc o in che modo esattamente le differenti cellule interagiscano tra loro e causino il processo fibrotico.

Le ipotesi più accreditate è che certi fattori eziologici, determinando anomalie nelle cellule vascolari, siano responsabili del danno microvascolare. L'endotelio danneggiato, media la migrazione e l'adesione leucocitaria di linfociti T e B che secernono grandi quantità di autoanticorpi, citochine e chemochine. Queste molecole causano attivazione di fibroblasti che in ultimo sono responsabili della fibrosi. (178)

La maggior parte dei ricercatori tuttavia supporta l'ipotesi che la 'malattia vascolare' rappresenti in assoluto il principale fattore eziopatologico della sclerodermia e che i vasi sanguigni siano il target dell'inizio del processo patologico. (179)

Il processo infiammatorio è molto marcato nella SSc e infiltrati infiammatori si osservano in una varietà di organi anche agli inizi della malattia insieme ad elevati livelli circolanti di citochine.

Se è pur vero che la genetica contribuisce senza dubbio alla patogenesi della malattia, tuttavia si stima che l'ereditabilità della SSc sia dell'ordine dello 0.008% (95% IC) quindi inficia in realtà solo in minima parte sulla sua insorgenza.

Il ruolo non prominente della genetica nel predisporre a SSc, è supportato dalle evidenze che nei gemelli monozigoti il tasso di concordanza per SSc era molto simile a quello osservato nei gemelli dizigoti. (180)

Studi genetici hanno mostrato che l'incidenza della malattia è pari a 1.5-1.7% nelle famiglie che hanno anamnesi positive per SSc in confronto con lo 0.026% nella popolazione generale. Seppure la SSc non segua l'eredità di tipo mendeliana, una storia familiare positiva aumenta in maniera significativa il suo rischio relativo (RR), da 15 a 19 volte nella progenie e da 13 a 15 volte nei familiari di primo grado. (181)

Ulteriori studi, hanno rivelato che il RR di sviluppare SSc è di 3.07 (95% CI, 1.25-7.57) nella prima generazione, rischio che sembra annullarsi alla quarta generazione. Inoltre si è dimostrato che, fatta eccezione per la seconda generazione, gli altri gruppi avevano un aumentato rischio di patologia interstiziale polmonare e che i soggetti della prima generazione avevano particolare predisposizione al fenomeno di Raynaud e ad altre patologie autoimmuni. (182)

Queste delucidazioni suggeriscono che l'informazione genetica contribuisce allo sviluppo della malattia, seppure in parte. Gli afroamericani mostrano un significativo aumento di incidenza della fibrosi polmonare, una peggiore funzione polmonare e aumentata frequenza di anticorpi Antitopoisomerasi I, anticorpi antiRNA-polimerasi III (ARA) rispetto alle popolazioni caucasiche o ispaniche.

Già da tempo inoltre era stata avanzata l'ipotesi che la suscettibilità genetica della malattia fosse connessa con alcuni aplotipi del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA). L'intuizione derivava da alcuni studi che indicavano la possibilità, durante la gravidanza che linfociti materni o fetali attraversassero la placenta e dessero inizio ad una reazione del tipo 'da trapianto verso l'ospite' (graft-versus-host-disease: GVHD) che sfociasse in sclerodermia. Infatti, nelle biopsie cutanee e nel sangue periferico ai pazienti

sclerodermici sono stati riscontrate cellule allogeniche ed esistono delle similitudini cliniche, sierologiche e istopatologiche, tra la sclerosi sistemica e la GVHD.(183)

A ulteriore testimonianza, in letteratura si riporta una associazione specifica tra alcuni alplotipi del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) e lo sviluppo della malattia.

Si descrive che antigeni HLA (A23, B18 e DR11), siano statisticamente aumentati nella SSc e correlino con manifestazioni cliniche più gravi, ma che non risultino strettamente legati ad uno specifico sottotipo di malattia. La suscettibilità mediata da diversi alplotipi potrebbe spiegare la differente predisposizione alla malattia tra le diverse razze.

A questo proposito, nei sudafricani, sono state riscontrate associazioni con DR2, DRB1*0301 e DRB1*11. Anche nei pazienti caucasici alcuni alplotipi sono associati con una maggior suscettibilità alla SSc, ad esempio l' HLA-DRB1*11 comporta maggior coinvolgimento cutaneo e nell'area mediterranea il 70% di pazienti affetti presenta l'antigene contro il 40% della popolazione sana.

Diverse linee di evidenza suggeriscono che, oltre alla genetica, fattori ambientali giocano un ruolo fondamentale nello scatenare lo sviluppo delle malattie autoimmuni compresa la SSc.

Il consenso è unanime nel ritenere che agenti ambientali rompono la tolleranza con modificazioni post-traslazionali e mimetismo molecolare inducendo anomalie negli antigeni self in grado di innescare una serie di reazioni immunitarie.(184)

Durante gli ultimi anni anche per lo studio della SSc l'epigenetica ha ricevuto una grande attenzione da parte dei clinici e ricercatori e alcune nuove informazioni sono già state ottenute. Di fatto, alterazioni ambientali indotte da fattori diversi quali virus, droghe, silice sono in grado di indurre fenotipi clinici simili o identici a quelli osservati nella sclerosi sistemica. (185)

Anche se la totalità dei meccanismi implicati non è stata ancora delucidata, le ricerche hanno mostrato che le modificazioni epigenetiche hanno un ruolo importante nella

complessa patogenesi della SSc e allo stato attuale sono stati identificati a livello molecolare meccanismi epigenetici (metilazione, acetilazione, microRNAs) che interessano diverse linee cellulari protagoniste della malattia (fibroblasti, linfociti, cellule dell'endotelio microvascolare). (186)

Metilazioni anomale del DNA sono state riscontrate a carico di geni che codificano per molecole chiave nella regolazione dei meccanismi vascolari.

Normalmente l'ossido nitrico, (NO) ha un ruolo antitrombotico e antiaterogeno poiché inibisce l'adesione dei leucociti all'endotelio, l'aggregazione piastrinica, e la proliferazione delle cellule microvascolari endoteliali. Una delle isoforme del gene che codifica per la maggior quantità di NO nell'endotelio (eNOS), risulta poco espressa nei pazienti con SSc il che facilita invece l'espressione di geni proinfiammatori, promitogeni e induttori di vasospasmo.

Si ritiene che questa ipoespressione possa dipendere da una ipermetilazione dato che ulteriori studi hanno verificato che la demetilazione del promotore di eNOS aumenta l'espressione dell'eNOSmRNA: questo gene potrebbe diventare un prossimo target per eventuali approcci terapeutici alla malattia. (187)

Aberrazioni nella metilazione del DNA sono state riscontrate anche a carico dei linfociti: una ipometilazione è stata dimostrata a carico delle cellule T CD4⁺ dei pazienti SSc quando confrontati con i pazienti di controllo. (188)

Più dell'80 % dei pazienti affetti da questa malattia sono di sesso femminile: proprio nel cromosoma X inattivo delle donne, è stata dimostrata la presenza di elementi CD40L regolatori demetilati; tale demetilazione porterebbe ad una sovraespressione di CD40L e potrebbe rappresentare una delle prime spiegazioni della maggiore suscettibilità del sesso femminile alla sclerodermia e la predilezione di genere della malattia. (189)

La metilazione del DNA coinvolge anche i fibroblasti: il gene Fli1, codificante per la molecola che sopprime il collagene, risulta metilato in alcune regioni CpG (CpG island),

e questo potrebbe essere uno dei cofattori per l'eccessivo accumulo di collagene e altre componenti della matrice extracellulare nella malattia. (190)

Di fronte alle 1426 sequenze di microRNA, ormai codificate nel genoma umano uno studio condotto da Li e collaboratori, ne ha individuati 24 diversamente espressi nella cute di pazienti con SSc e alcuni di questi sono risultati altamente e specificamente associati con la patogenesi della malattia.(191)

Un altro studio ha monitorato invece, la sovraespressione di miR-29b, che sembra avere un ruolo in prima linea nella fibrogenesi nella SSc tanto da essere stato identificato come target per eventuali interventi terapeutici. Confrontati con i controlli sani, i livelli di microRNA-29a sono significativamente ridotti nei fibroblasti e nelle sezioni dermiche di pazienti con SSC, suggerendo di interferire con le vie di importanti molecole quali PDGF-B e TGF-beta. (192)

Infine, i livelli sierici di microRNA-143-3p sono particolarmente aumentati nei pazienti con SSc e questo aumento è risultato positivamente correlato con la gravità della malattia, per cui è stato proposto che questo microRNA possa servire come un utile marker diagnostico di SSc. (193)

Si può dedurre che la flessibilità del sistema epigenetico, apre nuovi orizzonti alla possibilità di manipolare le vie epigenetiche e iniziare una nuova era nell'approccio terapeutico della SSc. Nella maggior parte dei casi la natura degli stimoli che scatenano le modificazioni epigenetiche tra i pazienti con SSc rimane sconosciuta, ma potrebbe includere fattori ambientali quali la dieta, fattori chimici, esposizione a silice, droghe, tossine, o fattori interni tra cui ormoni, ipossia, e stress ossidativo. (62)

Alla difficoltà di identificare lo stimolo ambientale che può dare inizio alla cascata di eventi, si somma il fatto che non sempre l'effetto dell'incontro con uno stimolo si esplica nella generazione esposta, ma piuttosto nelle generazioni successive, rendendo ancora più difficile l'identificazione del possibile fattore causale. In ultimo, ma non di minor conto,

lo stesso agente eziologico potrebbe essere responsabile nell'indurre più patologie, e fattori differenti potrebbero esacerbare una medesima presentazione clinica. Tra gli agenti infettivi che possono innescare la malattia in soggetti geneticamente predisposti, sono stati chiamati in causa alcuni virus quali il citomegalovirus (CMV), il virus dell'epatite C e il parvovirus B19.

Un aumento del DNA del parvovirus B19 nella cute delle pazienti con SSc ha mostrato la possibilità che il virus possa essere coinvolto nella patogenesi delle anomalie del tessuto cutaneo nella malattia. (194)

L'omologia osservata tra i virus e le cellule bersaglio degli autoanticorpi suggerisce che microcimerismi molecolari possano avere un ruolo nello scatenare la risposta anticorpale. Le cellule endoteliali potrebbero essere infettate da batteri o virus che giocano un ruolo nell'indurre la vasculite.

Nonostante i molti studi sull'argomento, il nesso causale diretto non è ancora stato trovato. Nella SSc prodotti virali potrebbero sinergizzare con altri fattori del microambiente predisponendo allo sviluppo di SSc.

Anche diversi fattori ambientali, connessi con le occupazioni lavorative, sono stati associati con lo sviluppo della malattia : la sclerodermia sembra essere più comune tra i lavoratori esposti a cloruro di vinile, tra quelli delle miniere di carbone e d'oro, o in quelli che si espongono alle polveri di silicio.

In modo particolare l'esposizione a silice cristallina è stata riscontrata anche in numerose altre patologie reumatologiche autoimmuni oltre la sclerodermia, tra cui l'artrite reumatoide, il LES, e le vasculiti ANCA-associate. Studi animali suggeriscono che la silice possa funzionare da innesco per le cellule T e indurre autoimmunità.(195)

Nella fattispecie, il particolato di silice, viene rilasciato nell'uranio, amianto, miniere d'oro, ma anche nella sabbiatura, perforazione, taglio del granito, lavorazione del terreno, lavori in cemento, e nelle polveri delle fabbriche. Una metanalisi ha riunito i risultati di

16 studi differenti sull'esposizione alla silice in relazione al rischio di sviluppare sclerodermia. Interessante è stato notare che il rischio era maggiore tra gli uomini che tra le donne: questo effetto potrebbe dipendere dalla mancanza di un numero elevato di donne che si espone alla silice o da una differente risposta a tale esposizione che dipende strettamente dal sesso dell'individuo.(196)

Anche Marie e coll. nel loro studio prospettico giungono alla conclusione che l'associazione tra SSc ed esposizione occupazionale potrebbe variare in funzione del genere. (197)

Anche l'esposizione a tossici quali gli idrocarburi aromatici come benzene, toluene o tricloroetilene, ha mostrato un nesso causale con la malattia, come sancito dal National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop, che nel 2012 ha approvato che l'esposizione a solventi contribuisce allo sviluppo di SSc. (198) Magnant e coll. hanno trovato correlazione tra esposizione a resine, solventi aromatici, silice e il coinvolgimento polmonare, il sottotipo di sclerosi diffusa (dSSc), e la negatività agli anticorpi anticentromero (ACA) concludendo che gli agenti tossici possono influenzare la gravità della malattia. (199)

In conclusione si può affermare che la patogenesi della SSc sia il risultato di una interazione complessa tra la suscettibilità genetica, l'esposizione ambientale e le modificazioni epigenetiche.

Parte Sperimentale

Obiettivi

Il presente studio è stato condotto con lo scopo principale di verificare se esiste una correlazione tra il basso peso alla nascita o la condizione di ‘piccolo per età gestazionale’ (‘small for gestational age’: SGA) e lo sviluppo della sclerosi sistemica (SSc) nell’età adulta.

Tuttavia altre variabili perinatali sono state prese in considerazione per valutare la possibile esistenza di un link con la malattia reumatologica oggetto di studio.

Il basso peso e la condizione di SGA, sono state valutate come indicatori di una alterazione della crescita in utero e quindi come la diretta conseguenza di un processo non fisiologico o patologico che abbia impedito al feto di raggiungere il suo massimo potenziale di crescita.

Popolazione e Metodi

Lo studio è del tipo caso-controllo multicentrico in cui l'arruolamento dei pazienti è avvenuto in un arco di tempo compreso tra giugno 2012 e novembre 2013.

Sono state incluse nello studio 332 pazienti affette da sclerosi sistemica afferenti alle cliniche reumatologiche dei seguenti quattro ospedali: Ospedale Universitario Careggi di Firenze, Ospedale Universitario La Sapienza di Roma, Fondazione San Matteo IRCCS Ospedale Universitario di Pavia, Ospedale Universitario di Ancona.

Sono state arruolate nello studio le pazienti che rispondevano ai criteri di classificazione per sclerodermia recentemente sviluppati dall'American College of Rheumatology/European League. (171)

Durante lo stesso periodo sono stati arruolati 243 soggetti di controllo afferenti ai reparti di chirurgia dell'Ospedale di Careggi, Firenze. L'appaiamento tra casi e controlli è stato ottenuto usando il metodo del 'frequency matching' per ottenere una distribuzione per sesso ed età simile in entrambi i gruppi ed impedire che alcune caratteristiche potessero confondere l'effetto di interesse.

Per ottenere i dati necessari è stato creato un questionario, sottoposto a tutte le pazienti da parte di personale medico preparato, al fine di ottenere le seguenti informazioni:

- età della paziente
- peso alla nascita
- età gestazionale alla nascita
- età della madre al momento del parto
- allattamento materno
- fumo materno in gravidanza

Per le sole pazienti sclerodermiche sono state anche valutate alcune tra le caratteristiche principali della malattia e tali informazioni sono state ottenute estrapolando direttamente i dati dagli archivi dei database dei quattro ospedali partecipanti allo studio.

Sono stati considerati i seguenti elementi della malattia: il pattern di autoanticorpi associato (anticorpi anticentromero: ACA; anticorpi anti-topoisomerasi I: Scl70, o entrambi: ACA +Scl70), l'età di insorgenza della malattia, il tipo di malattia: diffusa (dcSSc) o limitata (lcSSc), il coinvolgimento d'organo (cuore, articolazioni, apparato gastrointestinale), la presenza di ipertensione polmonare e di ulcere digitali. (**Tabella 1**)

Informazioni perinatali e anamnestiche
Data di nascita
Peso alla nascita
Età gestazionale alla nascita
Allattamento
Età della madre al momento del parto
Abitudine materna al fumo in gravidanza
Caratteristiche della malattia
Tipo di malattia: Limitata: lcSSc Diffusa: dcSSc
Anticorpi (ACA, Scl70, ACA+Scl70)
Età di insorgenza
Coinvolgimento cardiaco
Coinvolgimento articolare
Coinvolgimento gastrointestinale
Ipertensione polmonare
Ulcere digitali

Tabella 1. Informazioni ottenute dalle pazienti affette da SSc tramite questionario.

La scelta di un questionario come strumento per reperire informazioni concernenti la nascita, si è imposta di fronte alla mancanza di documenti ufficiali inerenti le caratteristiche auxologiche alla nascita delle pazienti.

I criteri di esclusione dallo studio sono stati i seguenti: la concomitante presenza di altre malattie autoimmuni per le pazienti sclerodermiche e la presenza di qualsiasi malattia autoimmune per i soggetti di controllo.

Per entrambi i gruppi sono stati esclusi anche i soggetti affetti da patologie per le quali è stata provata una correlazione con il basso peso alla nascita: malattie cardiovascolari quali stroke ed ipertensione, malattie metaboliche quali il diabete insulino indipendente.

(2, 6)

Un ulteriore criterio di esclusione è stata l'anamnesi positiva per fattori ambientali lavorativi identificati come possibili fattori di rischio per il manifestarsi della SSc tra cui silice, solventi organici, benzene, toluene, cloruro di vinile, tricloroetilene e resine epossidiche. (197)

La mancanza di riscontri oggettivi sulle caratteristiche antropometriche dello sviluppo in utero, quale quelli che si ottengono dall'ecografia fetale, ha imposto la necessità di dipendere da alcune misure indicative della crescita fetale, quali il peso alla nascita e l'età gestazionale.

In accordo con l'International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) il basso peso alla nascita è stato definito come un peso minore di 2500 g.

In base a tale parametro la popolazione di studio è stata suddivisa in tre categorie: basso peso (<2500g), normopeso (≥ 2500 <4000 g) e alto peso (≥ 4000 g). Inoltre in base all'età gestazionale (EG) le pazienti sono state suddivise in: nate pretermine (<37 settimane), a termine (37-41 settimane), post termine (>41 settimane).

La condizione di ‘piccolo per età gestazionale’ (‘small for gestational age’, SGA) è stata definita come un peso alla nascita <2500 g nei soggetti nati a termine.

Per verificare l’affidabilità delle informazioni ottenute dalle pazienti tramite il questionario, un numero pari a 40 casi e 40 controlli, scelti in maniera casuale, è stato sottoposto ad una successiva intervista.

Inoltre per dichiararne la validità, i dati riferiti sono stati confrontati con quelli raccolti nelle cartelle cliniche, controllo che è stato possibile solo per 40 pazienti affetti da SSc (12%) e 24 soggetti di controllo (10%).

I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica univariata e multivariata.

Le associazioni tra la sclerosi sistemica e il basso peso alla nascita e tra la sclerosi sistemica e la condizione di SGA, sono state espresse in termini di Odds Ratio (OR).

L’analisi multivariata ha testato l’associazione tra i differenti gruppi di peso alla nascita e la condizione di SGA e lo sviluppo di sclerosi sistemica in età adulta, correggendo per possibili fattori di confondimento.

Abbiamo stimato una dimensione del campione pari a 318 casi e 212 controlli assumendo una prevalenza di basso peso alla nascita (<2500 g) del 5% tra i controlli e un OR minimo apprezzabile di 3 (errore $\alpha = 5\%$ e potenza $(1 - \text{errore } \beta) = 90\%$).

Abbiamo escluso l’11% di soggetti da entrambi i gruppi di casi e controlli (66/575) a causa dell’incertezza del peso alla nascita (15.4% tra i casi e 6.2% tra i controlli); mentre la percentuale di incertezza riguardo all’età gestazionale è stata dell’ordine del 4.5% nei casi e di 0.0% tra i controlli.

Il Centro di malattie Rare dell’Ospedale Meyer di Firenze ha sviluppato il protocollo di ricerca, supervisionato i dati raccolti ed effettuato l’analisi statistica .

Lo studio ha ricevuto l’approvazione del Comitato Etico dell’Ospedale Universitario Pediatrico Meyer di Firenze il 23 Aprile 2012.

Risultati

Le caratteristiche della popolazione di studio sono presentate nella **Tabella 2**.

Come atteso, vista la prevalenza del sesso femminile nella malattia ed il metodo del 'frequency matching' adottato per arruolare i controlli, la nostra corte di studio è risultata essere composta prevalentemente da soggetti di sesso femminile (94.3%).

L'età media delle pazienti sclerodermiche si è dimostrata essere di poco superiore a quella dei controlli (59.1 vs. 56.1 anni). Le madri delle pazienti sclerodermiche avevano un'età maggiore al momento del parto rispetto a quelle dei soggetti di controllo (29.3 vs. 27.9 anni).

Sia la condizione di basso peso che quella di SGA si sono presentate con maggior frequenza tra i casi piuttosto che tra i controlli (13.9% vs. 6.9% e 12.0% vs. 5.8% rispettivamente). Anche la nascita pretermine ha dimostrato una maggior frequenza tra la popolazione dei casi, ma con una differenza minima rispetto a quella rilevata tra i controlli (2.7% vs. 1.6%).

La **Tabella 3** mostra l'analisi univariata prendendo in considerazione i seguenti parametri: il basso peso alla nascita, la condizione di SGA, l'età materna al momento del parto, l'età gestazionale alla nascita, l'allattamento e l'esposizione al fumo in gravidanza. Le pazienti nate con un basso peso hanno dimostrato avere un rischio aumentato di sclerosi sistemica nell'età adulta rispetto alle pazienti nate con un peso alto (OR 2.59, 95% IC 1.39-5.05).

Quando l'analisi si limita a valutare unicamente i soggetti di sesso femminile, tale associazione si conferma e l'OR aumenta ulteriormente fino ad un valore pari a 2.90.

Anche quando si prende in considerazione la variabile 'SGA' risulta che il rischio di sviluppare la malattia sia maggiore che nei neonati non-SGA (OR 2.60, 95% IC 1.34 - 5.32) e come per il basso peso, la potenza statistica della relazione aumenta per i soggetti di sesso femminile (OR 2.73, 95% IC 1.38 - 5.73).

Per entrambe le variabili prese in considerazione (basso peso, SGA) il rischio stimato si è dimostrato statisticamente significativo ($p < 0.05$).

L'età materna alla nascita ha mostrato un trend di associazione con lo sviluppo di sclerosi sistemica con un OR di 1.25 nella fascia di 25-29 anni, 1.58 nella fascia di 30-34 anni e 2.28 nelle donne con età >34 anni al momento del parto. Quindi l'età materna è risultata essere un fattore di rischio indipendente e aggiuntivo per lo sviluppo della malattia. Al contrario, l'allattamento al seno e l'abitudine al fumo in gravidanza non sono risultati associarsi ad un maggior rischio di sviluppo della malattia.

La **Tabella 4** mostra l'analisi multivariata limitata alle sole donne, attraverso due modelli matematici differenti. L'analisi ha valutato l'effetto indipendente del peso alla nascita (alto peso: ≥ 4000 g, normopeso: $\geq 2500 < 4000$ g, basso peso: < 2500 g), età gestazionale (a termine, pretermine, post-termine), età dei casi e controlli ed età materna al momento del parto.

Nell'analisi multivariata limitata ai soli casi di sesso femminile, l'OR della malattia nel gruppo di basso peso è risultato circa 4 volte maggiore di quello del gruppo di peso nella norma. Nessun rischio è stato osservato nei soggetti con peso alla nascita ≥ 4000 g, quando confrontato con i soggetti normopeso (2500-3999 g).

La stessa analisi multivariata ha inoltre mostrato che la condizione di SGA aumenta l'OR di malattia di circa 2.6 volte nel modello che include anche l'età dei soggetti di studio e l'età materna al momento del parto.

In entrambi i modelli, l'età delle pazienti è un fattore di rischio indipendente di malattia mostrandone un aumento del 4-5 % per ogni anno aggiuntivo.

La tabella 5 mostra alcune delle caratteristiche della malattia in associazione con il basso peso e la condizione di SGA: nessuna correlazione è stata trovata tra queste due variabili e l'età di insorgenza della malattia, né con il coinvolgimento di specifici organi e apparati

(cardiaco, polmonare, gastroenterico, articolare) o la presenza di ulcere e di ipertensione polmonare nelle pazienti.

Nel contesto della forte associazione tra il basso peso e lo sviluppo di sclerodermia nell'età adulta, vi è un rischio maggiore di sviluppare la forma limitata (lcSSc) rispetto alla forma diffusa (dcSSc) della malattia (OR = 0.36; IC 0.10-0.97).

I casi hanno dimostrato, per tutte le variabili, maggiori dati missing rispetto ai controlli.

Una spiegazione parziale di questo fenomeno potrebbe essere attribuita alla modesta differenza di età esistente tra i due gruppi, supponendo una più bassa capacità di memoria tra le pazienti più anziane (sclerodermiche).

In ogni caso simulando il peggior scenario possibile rispetto all'ipotesi primaria dello studio, abbiamo attribuito un alto peso (>2500 g) a tutte le pazienti del gruppo dei casi per le quali il dato risultava missing, e abbiamo ottenuto un OR significativamente maggiore all'unità (OR=2.1), validando in ogni caso i risultati del nostro studio.

Il protocollo di studio ha previsto la ripetizione del questionario in un gruppo randomizzato di pazienti appartenenti sia ai casi che ai controlli, ottenendo le medesime risposte, incluso il livello di incertezza attribuito al ricordo. La validità della concordanza tra i dati riportati e quelli registrati nelle cartelle mediche è risultata essere alta e non ha mostrato grandi differenze tra i casi (93%) e i controlli (95%).

Discussione

Il presente studio documenta che il basso peso alla nascita e la condizione di SGA rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo di sclerosi sistemica nell'età adulta, con una maggior potenza statistica per il basso peso.

Lo studio non ha osservato alcun rischio nei soggetti con alto peso alla nascita, in contrasto con altri studi epidemiologici che hanno dimostrato una correlazione significativa tra un peso alla nascita $\geq 4000\text{g}$ e lo sviluppo di patologie reumatologiche autoimmuni quali la sindrome di Sjögren e l'artrite reumatoide. (133, 136)

Anche Simard e colleghi nel loro studio, hanno osservato un aumentato rischio di sviluppare lupus eritematoso sistemico (LES) in età adulta sia nei neonati con alto peso alla nascita che in quelli nati prematuramente. (138)

Sembra plausibile che sia il basso peso alla nascita ($<2500\text{ g}$) che l'alto peso ($\geq 4000\text{g}$) possano influenzare la plasticità dello sviluppo, aumentando il rischio di patologia cronica autoimmune nell'età adulta.

L'eziologia della sclerosi sistemica è tuttora sconosciuta, tuttavia vi sono evidenze che riconoscono l'importanza, per il suo sviluppo, di meccanismi epigenetici che sono la conseguenza dell'interazione tra la suscettibilità genetica e specifici agenti ambientali. Alterazioni della metilazione del DNA, modificazione istoniche e cambiamenti nei microRNA sono state riscontrati in cellule di pazienti con SSc. (187-190)

Alla luce degli studi precedenti è possibile speculare sul possibile meccanismo patogenetico che può legare il basso peso alla nascita e lo sviluppo della malattia.

A tale proposito, studi hanno dimostrato che, in seguito ad un ambiente avverso in epoca gestazionale, l'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandole surrenali può risultare alterato e compromettere diversi sistemi. E' possibile infatti, che alcune condizioni di 'stress intrauterino' (insufficienza placentare o iponutrizione con conseguente restrizione fetale), possano indurre un'attivazione abnorme dell'asse ed indurre ipersecrezione di

glucocorticoidi. L'esposizione da parte del feto ad eccessive quantità di glucocorticoidi, potrebbe essere responsabile di cambiamenti nella differenziazione e proliferazione di cellule del sistema immune con alterazione del pattern di crescita degli organi coinvolti e conseguenze a lungo termine. (143)

Altri lavori identificano invece nel timo un possibile ruolo nello sviluppo della SSc.

Uno studio retrospettivo ha valutato la prevalenza di una incompleta involuzione timica, radiologicamente diagnosticata, in pazienti con SSc e artrite reumatoide e l'ha confrontata con un gruppo di controllo. Gli autori hanno riscontrato che una incompleta involuzione timica era molto più frequente tra le pazienti con SSc e artrite reumatoide che tra quelle del gruppo di controllo. (200)

Il timo gioca un ruolo centrale nella regolazione immunologica: è un organo linfoide primario necessario per il normale sviluppo e per la normale funzione dei linfociti T nonché per la produzione di diversi ormoni timici con proprietà periferiche immunomodulanti. E' stato osservato che neonati malnutriti in utero presentano atrofia timica. (110)

Disfunzioni timiche potrebbero quindi essere determinanti nel processo di mancato riconoscimento del self, quando cioè un trigger ambientale scatena il processo di autoimmunità in soggetti geneticamente predisposti. (201)

Inoltre è ormai ben noto che l'alterazione delle cellule dell'endotelio vascolare ('endothelial cell', EC) è un evento molto precoce nella patogenesi della SSc. (173)

Si ritiene che la vasoreattività anomala che si riscontra nella malattia, dipenda da un malfunzionamento delle cellule EC con conseguente vasocostrizione. I progenitori di tali cellule (EPCs), sono delle cellule immature che proliferano e migrano dal midollo osseo fin nei siti di neovascolarizzazione e si differenziano in cellule endoteliali mature in situ, assumendo un ruolo fondamentale nella riparazione e formazioni di nuovi vasi.

Uno studio recente, ha dimostrato che il neonati pretermine di basso peso alla nascita, quando confrontati con neonati a termine, presentano alterazioni delle funzioni delle cellule EPC con conseguente diminuita capacità angiogenetica. (202)

Il principale limite dello studio può essere attribuito alla inaccuratezza dei dati raccolti dato che provengono da una corte di nati negli anni 60'. Tuttavia le imprecisioni sono state attenuate dal controllo delle cartelle di nascita e da due interviste successive, metodi che sono già stati validati in altri studi. (203-205)

Questo è il primo studio che valuta la correlazione tra il basso peso alla nascita e lo sviluppo della sclerosi sistemica nell'età adulta. Data la rarità della malattia, la corte di pazienti costituita da 332 donne, va considerata ampia e questo conferisce maggior forza e validità al nostro studio.

Conclusioni

Ormai da tempo numerosi studi avanzano e continuano ad avanzare l'ipotesi per cui nascere di basso peso sia un fattore di rischio per lo sviluppo di alcune malattie croniche dell'età adulta.

I nostri dati mostrano una forte associazione tra il basso peso alla nascita e lo sviluppo di sclerosi sistemica nell'età adulta. Sono necessari ulteriori studi per chiarire i meccanismi patogenetici sottostanti per poter dichiarare che nascere con un basso peso sia un rischio per lo sviluppo di questa malattia.

Tabella 2. Caratteristiche della popolazione di studio.

		Casi (n=332)	Controlli(n=243)	Totale (n=575)
Età media in anni (DS)		59.1 (13.2)	56.1(6.2)	58.1 (11.5)
Età materna alla nascita (DS)		29.3 (6.0)	27.9 (5.8)	28.7 (5.9)
Sesso	maschi	15 (4.5%)	18 (7.4%)	33 (5.7%)
	femmine	317 (95.5%)	225 (92.6%)	542 (94.3%)
Peso alla nascita	missing	51 (15.4%)	15 (6.2%)	66 (11.5%)
	< 2500 g	46 (13.9%)	16 (6.6%)	62 (10.8%)
	≥2500 g	235 (70.8%)	212 (87.2%)	447 (77.7%)
Età gestazionale	missing	15 (4.5%)	2 (0.9%)	15 (2.6%)
	pretermine	9 (2.7%)	4 (1.6%)	13 (2.3%)
	a termine	299 (90.1%)	230 (94.6%)	531 (92.3%)
	post-termine	9 (2.7%)	7 (2.9%)	16 (2.8%)
SGA	missing	57 (17.2%)	15 (6.2%)	72 (12.5%)
	si	40 (12.0%)	14 (5.8%)	54 (9.4%)
	no	235 (70.8%)	214 (88.1%)	449 (78.1%)
Allattamento	missing	108 (32.5%)	4 (1.7%)	112 (19.5%)
	si	202 (60.8%)	217 (89.3%)	419 (72.9%)
	no	22 (6.7%)	22 (9.0%)	44 (7.6%)
Abitudine materna al fumo	missing	107 (32.2%)	7 (2.9%)	114 (19.8%)
	si	9 (2.7%)	12 (4.9%)	21 (3.6%)
	no	216 (65.1%)	224 (92.2%)	440 (76.5%)
Tipo di malattia	missing	13 (3.9%)		
	lcSSC	246 (74.1%)		
	dcSSC	73 (22.0%)		
Autoanticorpi	missing	96 (28.9%)		
	ACA	133 (40.1%)		
	ScI70	100 (30.1%)		
	ACA+ScI70	3 (0.9%)		

Tabella 3. Analisi Univariata: Odds Ratio di SSc per peso alla nascita, SGA, età materna alla nascita ed età gestazionale.

		Casi	Controlli	OR (IC 95%)
Peso alla nascita	< 2500 g	46	16	2.59 (1.39 – 5.05)
	≥2500 g	235	212	1.00
Peso alla nascita (sole femmine)	< 2500 g	46	14	2.90 (1.51 – 5.89)
	≥2500 g	224	198	1.00
SGA	si	40	14	2.60 (1.34 – 5.32)
	no	235	214	1.00
SGA (sole femmine)	si	40	13	2.73 (1.38 – 5.73)
	no	224	199	1.00
Età materna alla nascita (sole femmine)	< 25 anni	69	68	1.00
	25-29 anni	100	79	1.25 (0.80 – 1.95)
	30-34 anni	74	46	1.58 (0.96 – 2.61)
	> 34 anni	74	32	2.28 (1.34 – 3.88)
Età gestazionale (sole femmine)	37-41 anni	284	213	1.0
	< 37 anni	9	3	2.28 (0.61 - 8.53)
	> 41 anni	9	6	1.14 (0.40 - 3.25)
Allattamento	si	202	217	0.93 (0.50 – 1.73)
	no	22	22	1.0
Allattamento (sole femmine)	si	189	202	1.07 (0.54 – 2.14)
	no	20	23	1.0
Abitudine materna al fumo	si	9	12	0.78 (0.28 – 2.06)
	no	216	224	1.0
Abitudine materna al fumo (sole femmine)	si	8	11	0.74 (0.25 – 2.07)
	no	203	207	1.0

Tabella 4. Analisi Multivariata limitata al sesso femminile. Odds Ratio di SSc per gruppi di peso alla nascita, età, SGA, età materna alla nascita.

Modello 1: I casi in base ai gruppi di peso alla nascita in g,età in anni, età gestazionale in settimane, età materna alla nascita in anni.		
Parametri	Odds Ratio	I.C 95%
Peso alla nascita: 2500-3999	1.00	
Peso alla nascita: <2500	3.93	1.92 – 8.07
Peso alla nascita: ≥ 4000	1.06	0.57 – 1.98
Età (in anni)	1.04	1.02 – 1.06
Età gestazionale: 37-41	1.00	
Età gestazionale:<37 o >41	2.22	0.88 - 5.59
Età materna alla nascita: <25	1.00	
Età materna alla nascita: 25-29	1.23	0.71 – 2.14
Età materna alla nascita: 30-34	1.53	0.83 – 2.83
Età materna alla nascita: >34	2.23	1.16 – 4.26
Modello 2: I casi in base a SGA, età in anni, età materna alla nascita in anni		
Parametri	Odds Ratio	I.C 95%
SGA: No	1.00	
SGA: Si	2.58	1.28 – 5.19
Età (in anni)	1.05	1.03 – 1.07
Età materna alla nascita: <25	1.00	
Età materna alla nascita: 25-29	1.18	0.72 – 1.93
Età materna alla nascita: 30-34	1.46	0.84 – 2.56
Età materna alla nascita: >34	2.01	1.11 – 3.63

Tabella 5. Odds Ratio dell'età di insorgenza della malattia e del coinvolgimento d'organo in base all'esposizione al basso peso alla nascita e alla condizione di SGA. Analisi limitata al sesso femminile.

		Basso peso/no basso peso	SGA/non SGA
Tipo di malattia	Cutanea limitata (lcSSC)	1.0	1.0
	Cutanea diffusa (dcSSC)	0.36 (0.10-0.97)	0.43 (0.12-1.18)
Età di insorgenza	< 30 anni	1.0	1.0
	30-59 anni	1.68 (0.61-4.58)	1.81 (0.60-5.47)
	> 59 anni	1.71 (0.47-6.19)	2.37 (0.61-9.29)
Ipertensione Polmonare	no	1.0	1.0
	si	1.22 (0.34 – 3.68)	1.54 (0.42 – 4.73)
Ulcere digitali	no	1.0	1.0
	si	0.62 (0.26 – 1.35)	0.67 (0.27 – 1.53)
Coinvolgimento polmonare	no	1.0	1.0
	si	1.10 (0.53 – 2.32)	1.38 (0.63 – 3.15)
Coinvolgimento gastrointestinale	no	1.0	1.0
	si	1.53 (0.69 – 3.59)	1.67 (0.71 – 4.25)
Coinvolgimento cardiaco	no	1.0	1.0
	si	1.53 (0.15 – 8.67)	1.84 (0.17 – 10.52)
Coinvolgimento articolare	no	1.0	1.0
	si	0.56 (0.24 – 1.23)	0.61 (0.25 – 1.39)

Analisi Metabolomiche

La Metabolomica Clinica

Lo studio del metaboloma degli esseri viventi (ovvero la totalità dei metaboliti presenti in essi) ha fornito una nuova via d'indagine nella diagnostica clinica, offrendo un approccio olistico all'insieme delle reazioni che si sviluppano nella interazione “essere vivente-ambiente”, permettendo di caratterizzare separatamente la “perturbazione” relativa allo stato patologico, la predisposizione o affinità ad esso e la reazione specifica da parte dei sistemi funzionali dell'essere vivente. La metabolomica rappresenta un potente strumento per la Biologia dei Sistemi che è la moderna chiave d'interpretazione della dinamica dei sistemi viventi.

Un grande contributo alla costruzione di quest'architettura d'indagine deriva certamente dallo sviluppo delle tecniche di calcolo che si usano per l'interpretazione dei dati del metaboloma. Fino a qualche anno fa la Metabolomica esauriva il proprio percorso nella descrizione qualitativa e quantitativa dei metaboliti presenti nei biofluidi organici o negli estratti di tessuti solidi prelevati dagli organi in indagine. Nonostante la vocazione olistica di questa disciplina, in quest'approccio si trascurava la proiezione dei dati sulla intera rete d'interazioni funzionali che avvengono tra organi e sistemi. Numerosi studi hanno evidenziato come in certi casi l'interazione sistemica spiegasse il complesso di reazioni biochimiche alterate da alcune patologie o da influenze ambientali, fino a presentare poi l'esigenza di adottare un modello basato su interazioni funzionali di tutti i sistemi che negli esseri viventi si scambiano messaggi anche attraverso quelle membrane difensive che si diceva compartimentalizzassero, in maniera assoluta, organi e sistemi negli esseri viventi.

Da qui l'esigenza di proiettare i dati sui vari sistemi mediante la teoria delle reti complesse biochimiche per distinguere meglio perturbazione e risposta. Grazie allo

sviluppo degli strumenti informatici di analisi delle reti si è in grado di costruire il connettoma riguardante le alterazioni indotte nel sistema vivente da patologie e condizionamenti ambientali. Lo sviluppo delle tecniche di indagine molecolare ha poi indotto ulteriori avanzamenti nella Metabolomica Clinica sia aumentando il grado di gestibilità in automatico degli strumenti di misura sia aumentando la sensibilità e specificità nella quantificazione dei vari metaboliti.

Questo ha reso la Metabolomica Clinica terreno d'incontro di molte professionalità quali medici, fisici, biologi, chimici e informatici. Negli ambiti di ricerca prima si lavorava quasi a compartimenti stagni; ora i gruppi sperimentali interagiscono sempre di più in terreni di competenza multidisciplinare offrendo margini di stabilità e robustezza al processo clinico che ne deriva. **Da un punto di vista metodologico infine va evidenziato che il quadro generale della moderna medicina biologica prevede l'integrazione delle varie discipline "omiche" per una caratterizzazione completa dello stato clinico dei soggetti, patologici o in sospetto di rischio di contrarre una malattia.** La Bioinformatica, disciplina che sta diventando uno strumento particolarmente importante nella moderna Medicina, studia i livelli di interazione di genomica, transcriptomica, proteomica e metabolomica per costruire un approccio unificato di analisi di dati omici per una medicina personalizzata. (206)

La via alla scoperta di biomarkers di malattie per diagnosi precoci e monitoraggio di terapia passa attraverso l'unificazione delle varie scienze "omiche".

Tra le tecnologie analitiche utilizzate in Metabolomica riportiamo la spettroscopia in risonanza magnetica e la spettrometria di massa.

La spettroscopia in risonanza magnetica NMRS è una spettroscopia di assorbimento. Permette di rivelare l'assorbimento di radiazione elettromagnetica nella regione delle onde radio da parte dei nuclei con momento magnetico diverso da zero che possono scambiare energia in regime di risonanza con la radiazione incidente. La posizione di

questi nuclei nelle diverse molecole rende sia l'assorbimento di energia sia il suo rilascio, un fenomeno caratterizzante la molecola stessa anche in miscele complesse permettendo l'identificazione e la quantificazione delle varie componenti di fluidi e solidi biologici. La tecnologia NMRS è la stessa di quella dell'Imaging di Risonanza Magnetica dove, oltre ad aver aumentato le dimensioni del Bore a sviluppo orizzontale per permettere l'alloggiamento di soggetti viventi anziché provette con campioni biologici, si aggiunge la tecnologia dei gradienti di campo magnetico per permettere di etichettare spazialmente le regioni dello spazio da cui si acquisisce il segnale per costruire le immagini. In NMRS non è necessario costruire la "mappa spaziale" (i gradienti che eventualmente sono inseriti si utilizzano per altre funzioni) ma si considera un effetto che in Imaging in genere si trascura (a meno che non si stia facendo spettroscopia in vivo): il chemical shift, o spostamento chimico, il fenomeno per il quale un atomo risente energeticamente delle interazioni del suo intorno chimico.

La NMRS ha il particolare vantaggio di mostrare i segnali identificativi di decine di molecole attive all'NMR, ma ha una limitata sensibilità intrinseca ed elevati costi di acquisto e manutenzione per via dei fluidi criogenici usati per generare gli elevati campi magnetici richiesti in regime di superconduttività.

La spettrometria di massa è una tecnica analitica applicata sia all'identificazione di sostanze sconosciute, sia all'analisi in tracce di sostanze. E' comunemente usata in combinazione con tecniche separative, quali la gas-cromatografia e la cromatografia in fase liquida (LC). Il principio di funzionamento su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica utilizzando campi magnetici statici o oscillanti come "filtri" dei vari frammenti. La miscela di ioni si ottiene ionizzando le molecole del campione, generalmente bombardandole con un fascio di elettroni di energia nota. Le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro

struttura chimica. Il diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica è il cosiddetto spettro di massa, tipico di ogni molecola perché dipende dalla sua struttura chimica.

Le diverse tecniche analitiche producono una tabella di dati in cui in genere le colonne sono legate ai metaboliti rilevati e quantificati e le righe sono i diversi campioni analizzati.

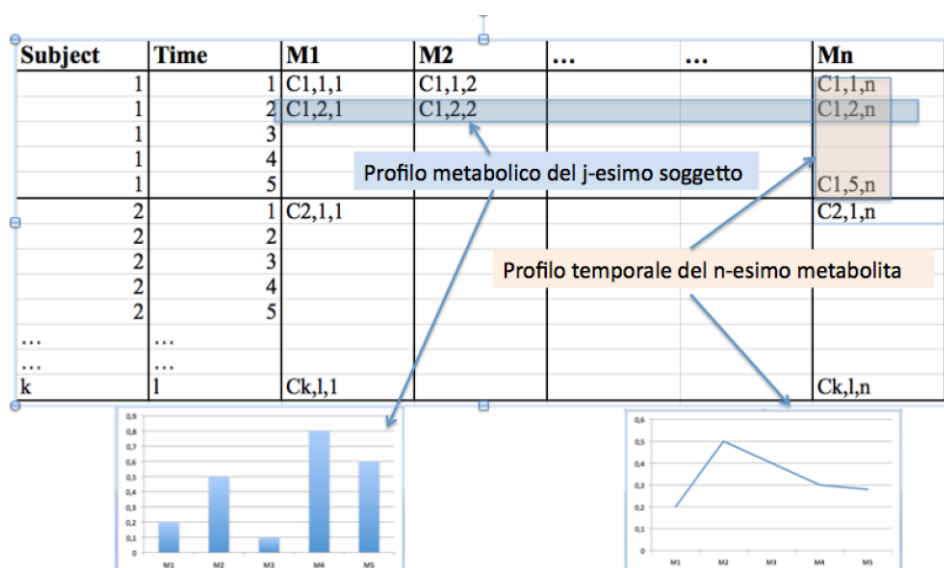


Figura 1.

Su di esse si applicano le tecniche di analisi statistica per individuare i possibili markers di malattia o i profili di metaboliti alterati.

I dati prodotti sono analizzati mediante tecniche di analisi univariata, multivariata e pattern recognition; a queste tecniche seguono le tecniche di Systems Biology per la quantificazione dei metaboliti, della loro interazione e delle relative reti che sono attivate a seguito delle perturbazioni in studio.

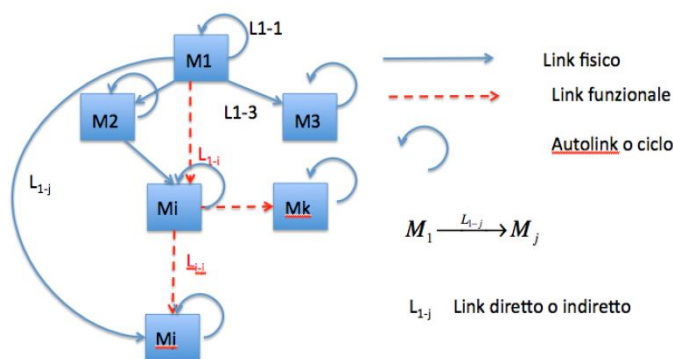


Figura 2.

Da queste reti derivano le indicazioni dei meccanismi di base implicati maggiormente nelle alterazioni funzionali introdotte dalle patologie.

Materiali e metodi

Sono stati raccolti ai fini dello studio, 30 campioni di urine di pazienti affette di sclerodermia e 20 campioni appartenenti a soggetti di controllo. In questo esperimento è stato studiato il metaboloma urinario mediante la tecnica della spettrometria di massa accoppiata a gas-cromatografia. I campioni di urine raccolti sono stati aliquotati in provette con sodiazide e conservate in freezer a -80° fino al momento dello studio. I campioni sono stati preparati per l'analisi in GC-MS secondo il protocollo descritto in **Appendice 1**. I campioni di urine preparati sono stati analizzati mediante uno spettrometro Agilent 5975C interfacciato ad un gas-cromatografo Agilent GC 7820.

E' stato creato un pool dei campioni per provvedere alla identificazione di tutti i metaboliti presenti ed è stata creata una libreria apposita di composti identificati utilizzando il database NIST2008 ed il software AMDIS (207); in alcuni casi è stato sintetizzato in laboratorio l'apposito standard per la verifica dell'identità del metabolita. Alcuni dei metaboliti sono però rimasti non identificati e questo sarà oggetto di uno studio successivo.

I dati ottenuti sono stati trattati mediante analisi statistica univariata e multivariata, e tramite i tools del sito: MetaboAnalyst3.0 <http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/> (208)

Risultati

Di seguito si riportano due cromatogrammi, relativi rispettivamente ad un soggetto del gruppo di controllo (Fig 3) e ad uno del gruppo dei patologici (Fig 4).

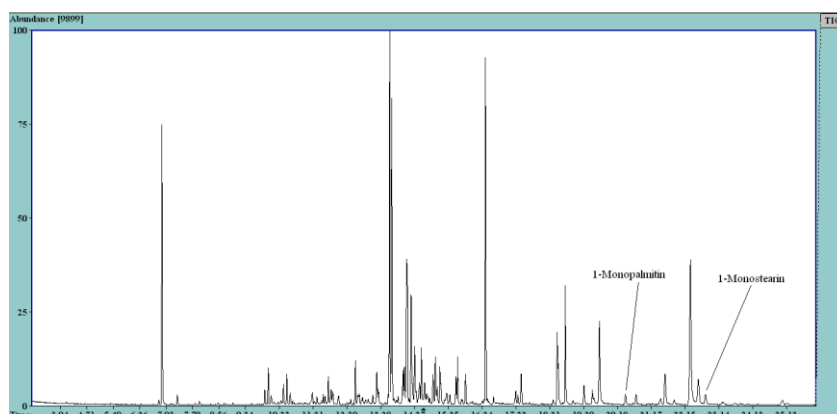


Fig 3.

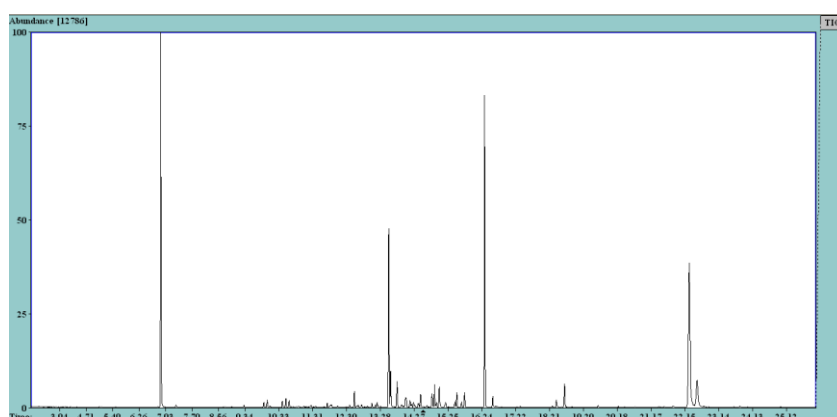


Fig 4.

Le quantificazioni realizzate hanno generato una matrice di dati M(50x141), 50 righe corrispondenti ai 30 soggetti patologici e ai 20 soggetti di controllo, per le 141 colonne corrispondenti ai metaboliti rilevati nel pool.

L'analisi univariata ha identificato un set di metaboliti significativamente variati nei due gruppi (**Tab1**).

L'analisi multivariata è stata condotta utilizzando il software disponibile sul web metaboanalyst; è stato costruito un modello PLS-DA (Fig 5) utilizzando la classificazione dei due gruppi, patologici-controlli. In questo modo le variazioni principali sono ricercate dall'algorithm lungo questa traiettoria di discriminazione.

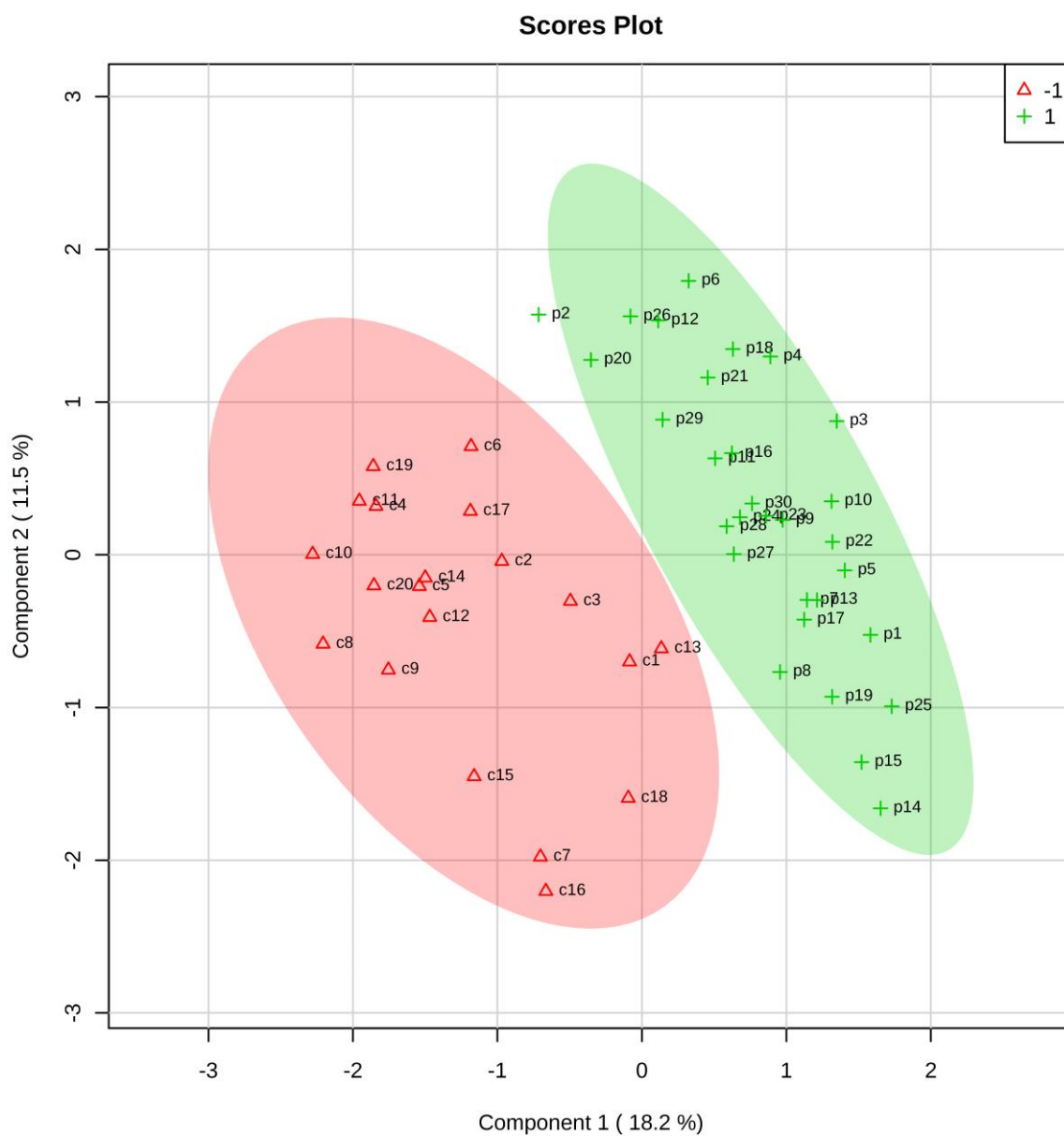


Fig 5 Modello PLS-DA

Il modello PLS-DA individua i due gruppi e le relative variabili implicate nella classificazione; l'urina, se da un lato è un biofluido di facile acquisizione, è senz'altro un biofluido "rumoroso" che trasporta informazioni che mascherano spesso le variazioni di interesse. Alimentazione, stato fisico generale del soggetto, farmaci assunti, rappresentano perturbazioni del metaboloma che possono mascherare tali variazioni.

Occorre quindi individuare i vari metaboliti coinvolti e classificarli come esogeni o endogeni anche in relazione alle informazioni e dati clinici raccolti in fase di reclutamento dei pazienti.

Il lavoro presentato è ancora in fase preliminare ma mostra chiaramente le potenzialità di diagnosi selettiva mediante la caratterizzazione dei fenotipi metabolici e le variabili metaboliche relative alla differenza tra i fenotipi individuati.

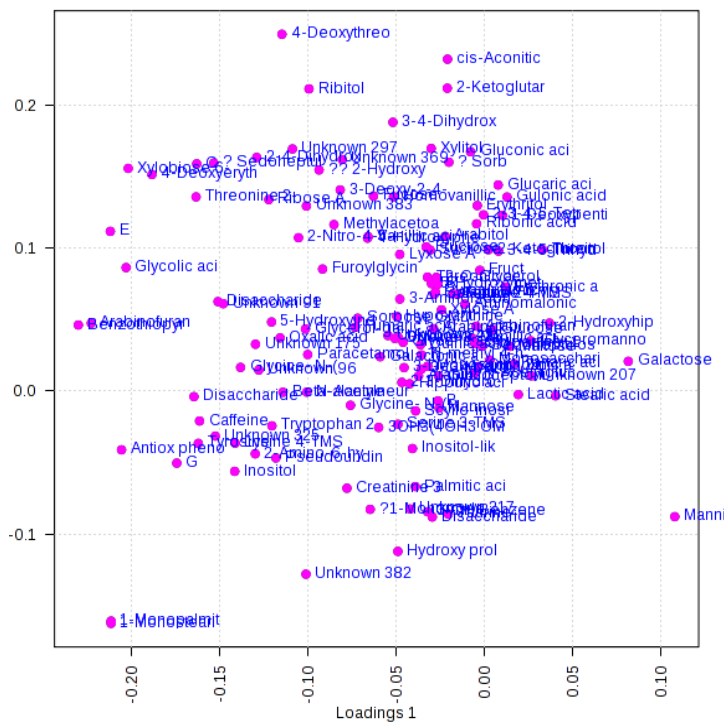


Fig. 6. Loadings delle variabili VIP

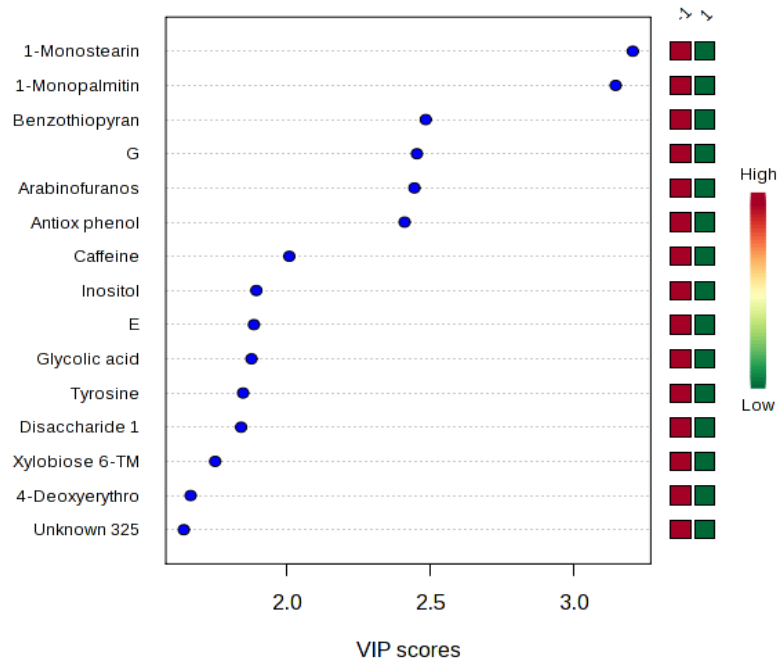


Fig. 7 Valori di scores delle VIP (variable of interest in the projection)

L'analisi dei dati ha permesso di ricavare le variazioni in termini di Fold-change rilevate nei due gruppi rispetto ai metaboliti di maggior significatività statistica.

N-Acetylneuraminic acid	473,28
3-OH Benzenepropanoic acid	320,04
Arabinofuranose	142,44
2-3-Dihydro-3,5-bis(3-methoxyphenyl)-1H-inden-1-one	116,83
Tryptophan	96,151
2-Amino-6-hydroxy-7-methyl-7H-purine	50,211
Serine	39,975
1-Monomyristin	24,919
Monosacch 217	12,917
1-Monostearin	12,553
Antiox phenol	10,054
1-Monopalmitin	8,6299
Mannose	8,5749
Disaccharide 1	6,5942
Beta-alanine	5,6521
5-Hydroxyindole-3-acetic acid	4,8967
Inositol	3,9165
Unknown 217	3,8762
Xylobiose	3,7538
Caffeine	3,7009
Benzothiopyran[4,3-b]benzo[e]indole	3,6517
Arabinofuranose derivative	3,635
Unknown 382	3,3891
Disaccharide 2	3,3019

Tab 1. Tabella delle variazioni di alcuni metaboliti nei due gruppi in studio

1-Monostearin

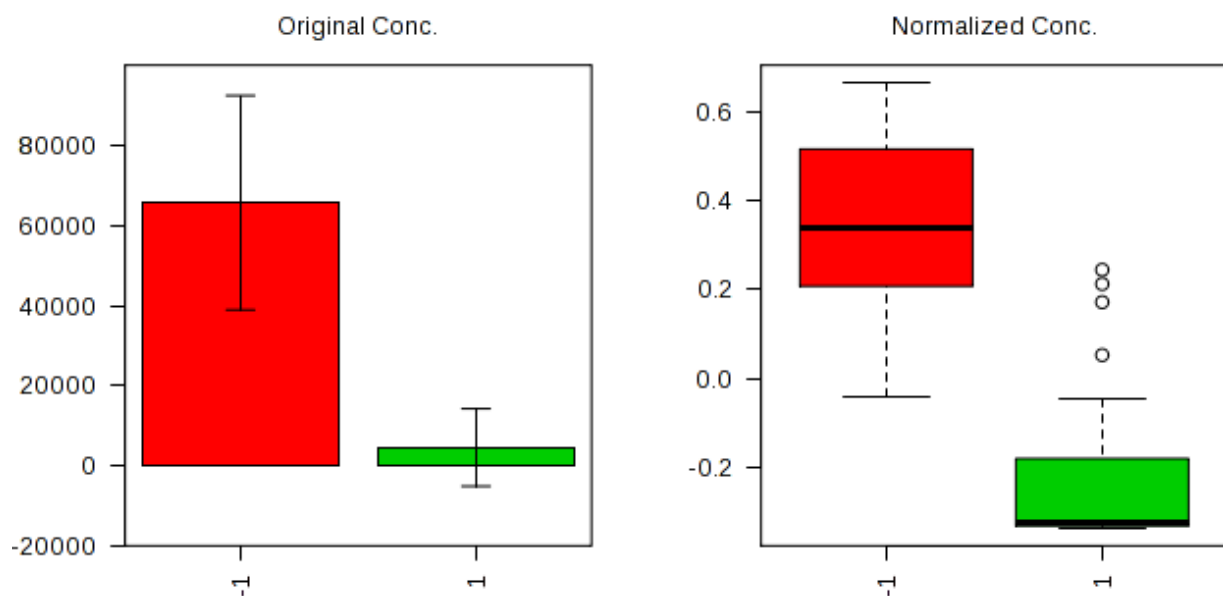


Fig.8 Boxplot per la Monostearina

1-Monopalmitin

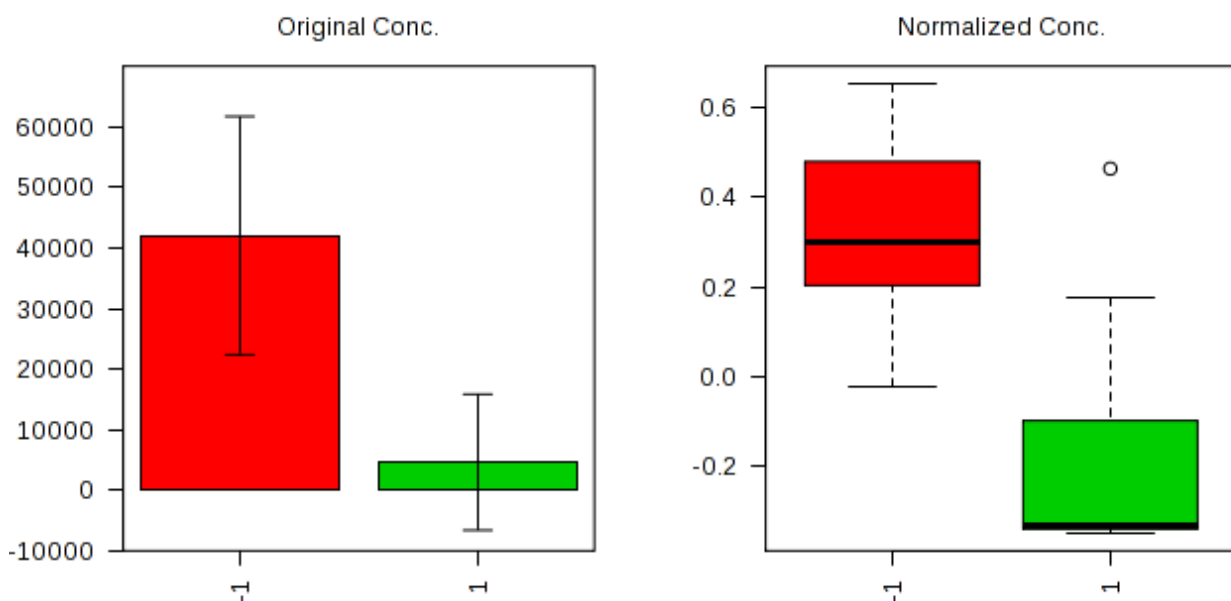


Fig. 9 Boxplot per la Monopalmitina

Conclusioni e sviluppi futuri di metabolomica

I dati ottenuti permettono di realizzare una matrice di dati per la caratterizzazione dei due fenotipi d'interesse. Il passo successivo sarà quello di introdurre tali dati nello studio delle reti metaboliche. I dati ricavati cominciano a gettare luce sui possibili meccanismi metabolici coinvolti nella sclerodermia, con particolare riguardo alle alterazioni dei percorsi amminoacidici e del ciclo di Krebs relativo ad alcuni acidi grassi. Le tecniche di analisi della Systems Biology permetteranno di evidenziare al meglio questi meccanismi e di individuare le migliori vie d'intervento per una diagnosi e il monitoraggio dei trattamenti.

Appendice 1

Protocollo per l'analisi GC-MS delle urine

Il campione di urine (già trattato con sodio azide al prelievo) viene agitato al vortex per omogeneizzare la soluzione. Si prelevano 10 μL da ogni campione per creare un campione "pooled" che, avendo una composizione riflettente quella di tutti gli altri campioni, possa essere usato come riferimento e controllo qualità nel corso dell'analisi. 150 μL di urine vengono trasferiti in una provetta Eppendorf da 2 mL con 800 μL di una soluzione acquosa di ureasi (1mg/mL) sottoponendola ad ultrasuoni per 30 min: si aggiungono quindi 800 μL di metanolo per denaturare l'enzima, si centrifuga il campione e si prelevano 1200 μL del surnatante che vengono trasferiti in vials di vetro ed evaporati a secchezza in una centrifuga da vuoto Eppendorf.

Si trattano quindi i campioni con 30 μL di metossilammina cloridrato in piridina (0.24M, 20 mg/ml), si agita al vortex per 1 min e si lascia reagire a T ambiente per 17 ore. Si aggiungono 30 μL di MSTFA (*N*-Methyl-*N*-trimetilsililtrifluoroacetammide), si agita al vortex per 1 min e si lascia reagire a T ambiente per 1 ora. Si diluisce il campione con 600 μL di esano anidro contenente tetracosano $\text{C}_{24}\text{H}_{50}$ (0.01 mg/ml) come standard interno. Si inietta alla GC-MS 1 μL del campione.

Parametri strumentali

Nel gas-cromatografo viene utilizzata una colonna DB5-MS (J & W), la temperatura dell'iniettore è di 230°C, quella del detector è di 280°C ed il range di masse analizzate è 50-700 amu. La temperatura del forno viene fatta variare secondo il seguente schema: Temperatura iniziale = 90°C per 1 min; Rampa = 10°C/min fino a 270°C, per 7 min, Ritardo del solvente = 3 min. Tempo totale di un'analisi = 26 min.

Bibliografia

1. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986 10;1:1077-81.
2. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993;341:938-41. Review.
3. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995;311:171-4.
4. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr* 2001;4 :611-24.
5. Barker DJ. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* 2004;93:26-33.
6. Barker DJ. A new model for the origins of chronic disease. *Med Health Care Philos* 2001; 4:31-5. Review.
7. Stanner SA, Bulmer K, Andrès C, Lantseva OE, Borodina V, Poteen VV, et al. Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *BMJ* 1997;315:1342-9.
8. Barker DJ, Osmond C, Kajantie E, Eriksson J. Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. *Ann Hum Biol* 2009;36:445-58.
9. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185:93-8.
10. Stein AD, Zybert PA, van der Pal-de Bruin K, Lumey LH. Exposure to famine during gestation, size at birth, and blood pressure at age 59 y: evidence from the Dutch Famine. *Eur J Epidemiol* 2006;21:759-65.

11. Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 1999;70:811–816.
12. Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, et al. Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr* 2006;84:322–327.
13. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 1976;295:349-53.
14. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001;60:5-20.
15. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development and patterns of disease. *Science* 2004;305:1773-6.
16. Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2011;41:158-76.
17. Osmond C, Barker DJP. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect* 2000;108:545-53.
18. Bateson P, Gluckman P, Hanson M. The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. *J Physiol* 2014;592:2357-68.
19. Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T. A conceptual framework for the developmental origins of health and disease. *J Dev Orig Health Dis* 2010;1:6-18.
20. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol* 2007;19:1-19.
21. Gillman MW, Barker D, Bier D, Cagampang F, Challis J, Fall C et al. Meeting report on the 3rd International Congress on Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *Pediatr Res* 2007;61:625-9.

22. Resnik R. Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol* 2002;99:490-6. Review.
23. Mayer C, Joseph KS. Fetal growth: a review of terms, concepts and issues relevant to obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:136-45.
24. Mandruzzato G, Antsaklis A, Botet F, Chervenak FA, Figueras F, Grunebaum A et al. Intrauterine restriction (IUGR). *J Perinat Med* 2008;36:277-81.
25. Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO. Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocr Rev* 2007; 28: 219-251.
26. Lockwood CJ, Weiner S. Assessment of fetal growth. *Clin Perinatol* 1986;13:3-35. Review.
27. Hindmarsh PC, Geary MP, Rodeck CH, Kingdom JC, Cole TJ. Intrauterine growth and its relationship to size and shape at birth. *Pediatr Res* 2002;52:263-8.
28. Malamitsi-Puchner A, Nikolaou KE, Puchner KP. Intrauterine growth restriction, brain-sparing effect, and neurotrophins. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1092:293-6. Review.
29. Patterson RM, Pouliot MR. Neonatal morphometrics and perinatal outcome: Who is growth retarded? *Am J Obstet Gynecol* 1987, 157:691–693.
30. Morrison JL, Duffield J.A, Muhulhausler BS, Gentili S, McMillen IC. Fetal growth restriction, catch-up growth and the early origins of insulin resistance and visceral obesity. *Pediatr Nephrol* 2009; 25:669–677.
31. Bergmann RL, Bergmann KE, Dudenhausen JW. Undernutrition and growth restriction in pregnancy. *Nestle Nutr. Workshop Ser Pediatr Program* 2008; 61:103–121.
32. Wu G, Imhoff-Kunsch B, Girard AW. Biological mechanisms for nutritional regulation of maternal health and fetal development. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2012;1:4-26.

33. Gardosi J, Madurasinghe V, Williams M, Malik A, Francis A. Maternal and fetal risk factors for stillbirth: population based study. *BMJ* 2013; 346:f108.
34. Mayer C, Joseph KS. Fetal growth: a review of terms, concepts and issues relevant to obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013 ;41:136- 45.
35. Anderson NH, Sadler LC, Stewart AW, McCowan LM. Maternal and pathological pregnancy characteristics in customised birthweight centiles and identification of at-risk small-for-gestational-age infants: a retrospective cohort study. *BJOG* 2012;119:848-56.
36. Gardosi J. New definition of small for gestational age based on fetal growth potential. *HormRes* 2006;65:158.
37. Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92:804–810.
38. Lee PA, Chernausk SD, Hokken-Koelega AC, Czernichow P: International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics* 2003;111:1253–1261.
39. Mullis PE, Tonella P. Regulation of fetal growth: consequences and impact of being born small. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22:173-90.
40. Kiely JL, Susser M. Preterm birth, intrauterine growth retardation, and perinatal mortality. *Am J Public Health* 1992;82:343-5.
41. EUROPEAN PERINATAL HEALTH REPORT. Health and Care of Pregnant Women and Babies in Europe in 2010.
42. Howson CP, Kinney MV, McDougall L, Lawn JE. Born Too Soon Preterm Birth Action Group. Born too soon: preterm birth matters. *Reprod Health* 2013;10 Suppl 1:S1.

43. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008; 371:75-84.
44. Bamfo JE, Odibo AO. Diagnosis and management of fetal growth restriction. *J Pregnancy* 2011;2011:640715.
45. Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)* 2007;113:1-13.
46. King JC. The risk of maternal nutritional depletion and poor outcomes increases in early or closely spaced pregnancies. *J Nutr* 2003;133:1732-1736. Review.
47. Christian P. Micronutrients, birth weight, and survival. *Annu Rev Nutr* 2010;30:83-104.
48. Sehested LT, Pedersen P. Prognosis and risk factors for intrauterine growth retardation. *Dan Med J* 2014;61:A4826.
49. Butler NR, Goldstein H, Ross EM. Cigarette smoking in pregnancy: its influence on birth weight and perinatal mortality. *Br Med J* 1972;2:127-30.
50. Voigt M, Briese V, Jorch G, Henrich W, Schneider KT, Straube S. The influence of smoking during pregnancy on fetal growth. Considering daily cigarette consumption and the SGA rate according to length of gestation. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2009;213:194-200.
51. Geary M, Crowley D, Boylan P. Passive cigarette smoking in pregnancy. *J Obstet Gynaecol* 1997;17:264-5.
52. Ko TJ, Tsai LY, Chu LC, Yeh SJ, Leung C, Chen CY et al. Parental smoking during pregnancy and its association with low birth weight, small for gestational age, and preterm birth offspring: a birth cohort study. *Pediatr Neonatol* 2014;55:20-7.
53. Sazak S, Kayıran SM, Paksoy Y. Umbilical cord serum erythropoietin levels and maternal smoking in pregnancy. *Scientific World Journal* 2012;2012:420763.

54. Iñiguez C, Ballester F, Costa O, Murcia M, Souto A, Santa-Marina L et al; INMA Study Investigators. Maternal smoking during pregnancy and fetal biometry: the INMA Mother and Child Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2013;178:1067-75.
55. DiFranza JR, Aligne CA, Weitzman M. Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children's health. *Pediatrics* 2004;113:1007-15. Review.
56. McCowan LM, Harding JE, Stewart AW. Customized birthweight centiles predict SGA pregnancies with perinatal morbidity. *BJOG* 2005;112:1026-33.
57. Risnes KR, Vatten LJ, Baker JL, Jameson K, Sovio U, Kajantie E et al. Birthweight and mortality in adulthood: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2011;40:647-61.
58. Gluckman PD, Cutfield W, Hofman P, Hanson MA. The fetal, neonatal, and infant environments-the long-term consequences for disease risk. *Early Hum Dev* 2005;81:51-9.
59. Garofano A, Czernichow P, Bréant B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia*. 1997;40:1231-4.
60. Limesand SW, Rozance PJ, Zerbe GO, Hutton JC, Hay WW Jr. Attenuated insulin release and storage in fetal sheep pancreatic islets with intrauterine growth restriction. *Endocrinology* 2006;147:1488-97.
61. Fisher DA. Thyroid system immaturities in very low birth weight premature infants. *Semin Perinatol* 2008;32:387-97.
62. Greer JM, McCombe PA. The role of epigenetic mechanisms and processes in autoimmune disorders. *Biologics* 2012;6:307-27.
63. Abu-Saad K, Fraser D. Maternal nutrition and birth outcomes. *Epidemiol Rev* 2010;32:5-25.

64. Gardosi J, Clausson B, Francis A. The value of customised centiles in assessing perinatal mortality risk associated with parity and maternal size. *BJOG* 2009;116:1356-63.
65. Haram K, Sjøfteland E, Bukowski R. Intrauterine growth restriction: effects of physiological fetal growth determinants on diagnosis. *Obstet Gynecol Int* 2013; 2013:708126.
66. Hogg K, Price EM, Hanna CW, Robinson WP. Prenatal and perinatal environmental influences on the human fetal and placental epigenome. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92:716-26.
67. Sibley CP, Turner MA, Cetin I, Ayuk P, Boyd CA, D'Souza SW et al. Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatr Res* 2005;58:827-32. Review.
68. Toal M, Chan C, Fallah S, Alkazaleh F, Chaddha V, Windrim RC et al. Usefulness of a placental profile in high-risk pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:363.
69. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003;69:1-7.
70. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet* 2004;43:487-514. Review.
71. Jansson T, Scholtbach V, Powell TL. Placental transport of leucine and lysine is reduced in intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 1998;44:532-7.
72. Paolini CL, Marconi AM, Ronzoni S, Di Noio M, Fennessey PV, Pardi G et al. Placental transport of leucine, phenylalanine, glycine, and proline in intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5427-32.
73. Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, Refsum H, Rao S, Fisher DJ et al. Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia* 2008;51:29-38.

74. Kalra P, Das V, Agarwal A, Kumar M, Ramesh V, Bhatia E et al. Effect of vitamin D supplementation during pregnancy on neonatal mineral homeostasis and anthropometry of the newborn and infant. *Br J Nutr* 2012;108:1052-8.
75. Ashworth CJ, Antipatis C. Micronutrient programming of development throughout gestation. *Reproduction* 2001;122:527-35. Review.
76. Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE. Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. *J Anim Sci* 2006; 84:2316–2337.
77. Wallace JM, Milne JS, Aitken RP. Maternal growth hormone treatment from day 35 to 80 of gestation alters nutrient partitioning in favor of uteroplacental growth in the overnourished adolescent sheep. *Biol Reprod* 2004;70:1277-85.
78. Anderson NH, Sadler LC, Stewart AW, Fyfe EM, McCowan LM. Independent risk factors for infants who are small for gestational age by customised birthweight centiles in a multi-ethnic New Zealand population. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2013;53:136-42.
79. Godfrey K, Robinson S, Barker DJ, Osmond C, Cox V. Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *BMJ* 1996;312:410-4.
80. Kramer MS. High protein supplementation in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; (2):CD000105. Review.
81. Campbell DM, Hall MH, Barker DJ, Cross J, Shiell AW, Godfrey KM. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:273-80.
82. Angiolini E, Fowden A, Coan P, Sandovici I, Smith P, Dean W et al. Regulation of placental efficiency for nutrient transport by imprinted genes. *Placenta* 2006;27:98-102.
83. Sandovici I, Hoelle K, Angiolini E, Constância M. Placental adaptations to the maternal-fetal environment: implications for fetal growth and developmental programming. *Reprod Biomed Online* 2012;25:68-89.

84. Sibley CP, Brownbill P, Dilworth M, Glazier JD. Review: Adaptation in placental nutrient supply to meet fetal growth demand: implications for programming. *Placenta* 2010;31:70-4.
85. Fowden AL, Ralph MM, Silver M. Nutritional regulation of uteroplacental prostaglandin production and metabolism in pregnant ewes and mares during late gestation. *Exp Clin Endocrinol* 1994;102:212-21. Review.
86. Zamudio S, Torricos T, Fik E, Oyala M, Echalar L, Pullockaran J et al. Hypoglycemia and the origin of hypoxia-induced reduction in human fetal growth. *PLoS One* 2010;5:e8551.
87. Marconi AM, Paolini CL. Nutrient transport across the intrauterine growth-restricted placenta. *Semin Perinatol* 2008;32:178-81.
88. Van Speybroeck L. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann N Y Acad Sci* 2002;981:61-81. Review.
89. Wilkins JF. Genomic imprinting and methylation: epigenetic canalization and conflict. *Trends Genet* 2005;21:356-65. Review.
90. Rakyan VK, Preis J, Morgan HD, Whitelaw E. The marks, mechanisms and memory of epigenetic states in mammals. *Biochem J* 2001;356:1-10. Review.
91. Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009;136:26-36. Review.
92. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303:83-6.
93. Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:192-206.

94. Dolinoy DC. Epigenetic gene regulation: early environmental exposures. *Pharmacogenomics* 2007;8:5-10.
95. Waterland RA. Does nutrition during infancy and early childhood contribute to later obesity via metabolic imprinting of epigenetic gene regulatory mechanisms? *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2005;56:157-71; discussion 171-4. Review.
96. Poulsen P, Esteller M, Vaag A, Fraga MF. The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. *Pediatr Res* 2007;61:38-42
97. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2002 ;241:172-82.
98. Jones L, Hamilton AJ, Voinnet O, Thomas CL, Maule AJ, Baulcombe DC. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 1999;11:2291-301.
99. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007;39:457-66.
100. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992;69(6):915-26.
101. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157:40-4. Review.
102. Imdad A, Bhutta ZA. Routine iron/folate supplementation during pregnancy:effect on maternal anaemia and birth outcomes. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2012;26:168-77.
103. Chmurzynska A. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. *Nutr Rev* 2010;68:87-98.
104. Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal

periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:19351-6.

105. Bertram CE, Hanson MA. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br Med Bull* 2001;60:103-21. Review.

106. Burns SP, Desai M, Cohen RD, Hales CN, Iles RA, Germain JP et al. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest* 1997;100:1768-74.

107. Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr* 2007;97:1036-46.

108. Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, et al. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci* 2005;25:11045-54.

109. Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, Laksana GS, Hsu JL, Lane RH. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:962-70.

110. Calder PC, Krauss-Etschmann S, de Jong EC, Dupont C, Frick JS, Frokiaer H et al. Early nutrition and immunity - progress and perspectives. *Br J Nutr* 2006;96(4):774-90.

111. Palmer AC. Nutritionally mediated programming of the developing immune system. *Adv Nutr*. 2011;2(5):377-95.

112. Enke U, Seyfarth L, Schleussner E, Markert UR. Impact of PUFA on early immune and fetal development. *Br J Nutr* 2008 ;100:1158-68.

113. Mold JE, McCune JM. Immunological tolerance during fetal development: from mouse to man. *Adv Immunol* 2012;115:73-111.

114. Chen X, Welner RS, Kincade PW. A possible contribution of retinoids to regulation of fetal B lymphopoiesis. *Eur J Immunol* 2009 ;39:2515-24.
115. Savino W, Dardenne M, Velloso LA, Dayse Silva-Barbosa S. The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br J Nutr* 2007;98:11-6. Review.
116. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 2006;6:127-35. Review.
117. Takahama Y, Saito T, Kawamoto H, Itoi M, Boyd RL, Chidgey A et al. The Global Thymus Network: past, present and future. *Trends Immunol.* 2009;30:191-2.
118. West LJ. Defining critical windows in the development of the human immune system. *Hum Exp Toxicol.* 2002 ;21:499-505. Review.
119. Chandra RK. Protein-energy malnutrition and immunological responses. *J Nutr* 1992 ;122:597-600.
120. Malpuech-Brugère C, Nowacki W, Gueux E, Kuryszko J, Rock E, Rayssiguier Y et al. Accelerated thymus involution in magnesium-deficient rats is related to enhanced apoptosis and sensitivity to oxidative stress. *Br J Nutr* 1999;81:405-11.
121. Fraker PJ, Osati-Ashtiani F, Wagner MA, King LE. Possible roles for glucocorticoids and apoptosis in the suppression of lymphopoiesis during zinc deficiency: a review. *J Am Coll Nutr* 1995;14:11-7. Review.
122. Cromi A, Ghezzi F, Raffaelli R, Bergamini V, Siesto G, Bolis P. Ultrasonographic measurement of thymus size in IUGR fetuses: a marker of the fetal immunoendocrine response to malnutrition. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33:421-6.
123. Jeppesen DL, Ersbøll AK, Hoppe TU, Nielsen SD, Valerius NH. Normal Thymic Size and Low Rate of Infections in Human Donor Milk Fed HIV-Exposed Uninfected Infants from Birth to 18 Months of Age. *Int J Pediatr* 2013;2013:373790.

124. Olearo E, Oberto M, Oggè G, Botta G, Pace C, Gaglioti P, Todros T. Thymic volume in healthy, small for gestational age and growth restricted fetuses. *Prenat Diagn* 2012;32:662-7.
125. Correa-Rocha R, Pérez A, Lorente R, Ferrando-Martínez S, Leal M, Gurbindo D, Muñoz-Fernández MÁ. Preterm neonates show marked leukopenia and lymphopenia that are associated with increased regulatory T-cell values and diminished IL-7. *Pediatr Res* 2012;71:590-7.
126. Currie AJ, Curtis S, Strunk T, Riley K, Liyanage K, Prescott S, Doherty D, Simmer K, Richmond P, Burgner D. Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus. *Infect Immun* 2011;79:1588-96.
127. Hviid A, Melbye M. The impact of birth weight on infectious disease hospitalization in childhood. *Am J Epidemiol* 2007;165:756-61.
128. Li J, Li H, Mao H, Yu M, Yang F, Feng T, et al. Impaired NK cell antiviral cytokine response against influenza virus in small-for-gestational-age neonates. *Cell Mol Immunol* 2013;10:437-43
129. Thomas RM, Linch DC. Identification of lymphocyte subsets in the newborn using a variety of monoclonal antibodies. *Arch Dis Child* 1983;58:34-8.
130. Wirbelauer J, Thomas W, Rieger L, Speer CP. Intrauterine growth retardation in preterm infants ≤ 32 weeks of gestation is associated with low white blood cell counts. *Am J Perinatol* 2010 ;27:819-24.
131. Phillips DI, Cooper C, Fall C, Prentice L, Osmond C, Barker DJ, Rees Smith B. Fetal growth and autoimmune thyroid disease. *Q J Med*. 1993;86:247-53.
132. Kajantie E, Phillips DI, Osmond C, Barker DJ, Forsén T, Eriksson JG. Spontaneous hypothyroidism in adult women is predicted by small body size at birth and during childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4953-6.

133. Jacobsson LT, Jacobsson ME, Askling J, Knowler WC. Perinatal characteristics and risk of rheumatoid arthritis. *BMJ* 2003;326:1068-9.
134. Mandl LA, Costenbader KH, Simard JF, Karlson EW. Is birthweight associated with risk of rheumatoid arthritis? Data from a large cohort study. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:514-8.
135. Parks CG, D'Aloisio AA, DeRoo LA, Huiber K, Rider LG, Miller FW et al. Childhood socioeconomic factors and perinatal characteristics influence development of rheumatoid arthritis in adulthood. *Ann Rheum Dis* 2013;72:350-6.
136. Mostafavi B, Akyuz S, Jacobsson ME, Nilsen LV, Theander E, Jacobsson LH. Perinatal characteristics and risk of developing primary Sjögren's syndrome: a case-control study. *J Rheumatol* 2005;32:665-8.
137. Coleman LA, Naleway AL, Davis ME, Greenlee RT, Wilson D, McCarty DJ. Birth weight and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2005;14:526-8.
138. Simard JF, Karlson EW, Costenbader KH, Hernán MA, Stampfer MJ, Liang MH et al. Perinatal factors and adult-onset lupus. *Arthritis Rheum* 2008;59:1155-61.
139. Bertram CE, Hanson MA. Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction* 2002;124:459-67. Review.
140. Reynolds RM. Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: two decades of testing the hypothesis--2012 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38:1-11.
141. Cohen JJ, Duke RC. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1984;132:38-42.
142. Jones A, Godfrey KM, Wood P, Osmond C, Goulden P, Phillips DI. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1868-71.

143. Cottrell EC, Holmes MC, Livingstone DE, Kenyon CJ, Seckl JR. Reconciling the nutritional and glucocorticoid hypotheses of fetal programming. *FASEB J* 2012;26:1866-74.
144. Drake AJ, McPherson RC, Godfrey KM, Cooper C, Lillycrop KA, Hanson MA et al. An unbalanced maternal diet in pregnancy associates with offspring epigenetic changes in genes controlling glucocorticoid action and foetal growth. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012 ;77:808-15.
145. DePasquale-Jardieu P, Fraker PJ. Further characterization of the role of corticosterone in the loss of humoral immunity in zinc-deficient A/J mice as determined by adrenalectomy. *J Immunol.* 1980;124:2650-5.
146. Hollingsworth JW, Maruoka S, Boon K, Garantziotis S, Li Z, Tomfohr J, Bailey N et al. In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *J Clin Invest* 2008;118:3462-9.
147. Molina V, Medici M, Taranto MP, Font de Valdez G. Effects of maternal vitamin B12 deficiency from end of gestation to weaning on the growth and haematological and immunological parameters in mouse dams and offspring. *Arch Anim Nutr* 2008;62:162-8.
148. Håberg SE, London SJ, Stigum H, Nafstad P, Nystad W. Folic acid supplements in pregnancy and early childhood respiratory health. *Arch Dis Child* 2009;94:180-4.
149. Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaidis KH, Schneider H. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1996;36:248-55.
150. Cavalcante RS, Kopelman BI, Costa-Carvalho BT. Placental transfer of *Haemophilus influenzae* type b antibodies in malnourished pregnant women. *Braz J Infect Dis* 2008;12:47-51.
151. Islam T, Gauderman WJ, Cozen W, Hamilton AS, Burnett ME, Mack TM. Differential twin concordance for multiple sclerosis by latitude of birthplace. *Ann Neurol* 2006;60:56-64.

152. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med* 2008;359:2849-50.
153. Subrahmanyam R, Sen R. Epigenetic features that regulate IgH locus recombination and expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012;356:39-63.
154. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2009;60:3613-22.
155. Mastronardi FG, Noor A, Wood DD, Paton T, Moscarello MA. Peptidyl argininedeiminase 2 CpG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated. *J Neurosci Res* 2007;85:2006-16.
156. Wen ZK, Xu W, Xu L, Cao QH, Wang Y, Chu YW, Xiong SD. DNA hypomethylation is crucial for apoptotic DNA to induce systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in SLE-non-susceptible mice. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46:1796-803.
157. Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD et al; Canadian Collaborative Study Group. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 2006;5:932-6.
158. Gardener H, Munger KL, Chitnis T, Michels KB, Spiegelman D, Ascherio A. Prenatal and perinatal factors and risk of multiple sclerosis. *Epidemiology* 2009;20:611-8.
159. Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Mahfooz N, Carl E, Drake A, Schneider J et al. Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2011 4;8:127.
160. Matarese G, Carrieri PB, La Cava A, Perna F, Sanna V, De Rosa V et al. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:5150-5.

161. Crowson CS, Matteson EL, Davis JM 3rd, Gabriel SE. Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013;65:71-7.
162. Derdemezis CS, Voulgari PV, Drosos AA, Kiortsis DN. Obesity, adipose tissue and rheumatoid arthritis: coincidence or more complex relationship? *Clin Exp Rheumatol* 2011;29:712-27.
163. Sinicato NA, Postal M, Peres FA, Pelicari Kde O, Marini R, dos Santos Ade O, Ramos CD, Appenzeller S. Obesity and cytokines in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *J Immunol Res* 2014;2014:162047.
164. Wollheim FA. Classification of systemic sclerosis. Visions and reality. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1212-6. Review.
165. Chiffot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* 2008;37:223-35. Review.
166. Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003;48:2246-55.
167. Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:165-70.
168. Agarwal SK, Tan FK, Arnett FC. Genetics and genomic studies in scleroderma (systemic sclerosis). *Rheum Dis Clin North Am* 2008;34:17-40.
169. Fleischmajer R, Jacobs L, Schwartz E, Sakai LY. Extracellular microfibrils are increased in localized and systemic scleroderma skin. *Lab Invest* 1991;64:791-8.
170. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1980;23:581-90.

171. Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1747-55.
172. Wigley FM. Clinical practice. Raynaud's Phenomenon. *N Engl J Med* 2002 26;347:1001-8. Review.
173. Viswanath V, Phiske MM, Gopalani VV. Systemic sclerosis: current concepts in pathogenesis and therapeutic aspects of dermatological manifestations. *Indian J Dermatol* 2013;58:255-68.
174. Ebert EC. Esophageal disease in scleroderma. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:769-75. Review.
175. Wielosz E, Dryglewska M, Majdan M. Serological profile of patients with systemic sclerosis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2014;68:987-91.
176. Nikpour M, Baron M. Mortality in systemic sclerosis: lessons learned from population-based and observational cohort studies. *Curr Opin Rheumatol* 2014;26:131-7.
177. Sampaio-Barros PD, Bortoluzzo AB, Marangoni RG, Rocha LF, Del Rio AP, Samara AM et al. Survival, causes of death, and prognostic factors in systemic sclerosis: analysis of 947 Brazilian patients. *J Rheumatol* 2012;39:1971-8.
178. Varga J. Systemic sclerosis: an update. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2008;66:198-202. Review.
179. Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: evidence that systemic sclerosis is a vascular disease. *Arthritis Rheum* 2013 ;65:1953-62.
180. Feghali-Bostwick C, Medsger TA Jr, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;48:1956-63.

181. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 2001;44:1359-62.
182. Frech T, Khanna D, Markewitz B, Mineau G, Pimentel R, Sawitzke A. Heritability of vasculopathy, autoimmune disease, and fibrosis in systemic sclerosis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2010;62:2109-16.
183. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A et al. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet*. 1998;351:559-62.
184. Selmi C, Leung PS, Sherr DH, Diaz M, Nyland JF, Monestier M et al. Mechanisms of environmental influence on human autoimmunity: a National Institute of Environmental Health Sciences expert panel workshop. *J Autoimmun* 2012;39:272-84.
185. Nietert PJ, Silver RM. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:520-6. Review.
186. Luo Y, Wang Y, Wang Q, Xiao R, Lu Q. Systemic sclerosis: genetics and epigenetics. *J Autoimmun* 2013;41:161-7.
187. Romero LI, Zhang DN, Cooke JP, Ho HK, Avalos E, Herrera R, Herron GS. Differential expression of nitric oxide by dermal microvascular endothelial cells from patients with scleroderma. *Vasc Med* 2000;5:147-58.
188. Lei W, Luo Y, Lei W, Luo Y, Yan K, Zhao S et al. Abnormal DNA methylation in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and dermatomyositis. *Scand J Rheumatol* 2009;38:369-74.
189. Lian X, Xiao R, Hu X, Kanekura T, Jiang H, Li Y et al. DNA demethylation of CD401 in CD4+ T cells from women with systemic sclerosis: a possible explanation for female susceptibility. *Arthritis Rheum* 2012;64:2338-45.

190. Wang Y, Fan PS, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2006;54:2271-9.
191. Li H, Yang R, Fan X, Gu T, Zhao Z, Chang D, Wang W. MicroRNA array analysis of microRNAs related to systemic scleroderma. *Rheumatol Int* 2012;32:307-13.
192. Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010;62 :1733-43.
193. Makino K, Jinnin M, Kajihara I, Honda N, Sakai K, Masuguchi S et al. Circulating miR-142-3p levels in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol* 2012;37:34-9.
194. Radić M, Martinović Kaliterna D, Radić J. Infectious disease as aetiological factor in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Neth J Med* 2010;68:348-53. Review.
195. Otsuki T, Maeda M, Murakami S, Hayashi H, Miura Y, Kusaka M et al. Immunological effects of silica and asbestos. *Cell Mol Immunol* 2007;4:261-8. Review.
196. McCormic ZD, Khuder SS, Aryal BK, Ames AL, Khuder SA. Occupational silica exposure as a risk factor for scleroderma: a meta-analysis. *Int Arch Occup Environ Health* 2010;83:763-9.
197. Marie I, Gehanno JF, Bubenheim M, Duval-Modeste AB, Joly P, Dominique S et al. Prospective study to evaluate the association between systemic sclerosis and occupational exposure and review of the literature. *Autoimmun Rev* 2014;13:151-6.
198. Miller FW, Alfredsson L, Costenbader KH, Kamen DL, Nelson LM, Norris JM et al. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J Autoimmun* 2012;39:259-71.

199. Magnant J, de Monte M, Guilmot JL, Lasfargues G, Diot P, Asquier E et al. Relationship between occupational risk factors and severity markers of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2005;32:1713-8.
200. Meunier M, Bazeli R, Feydy A, Drape JL, Kahan A, Allanore Y. Incomplete thymic involution in systemic sclerosis and rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2013;80:48-51.
201. Ferri C, Colaci M, Battolla L, Giuggioli D, Sebastiani M. Thymus alterations and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:72-5.
202. Ligi I, Simoncini S, Tellier E, Vassallo PF, Sabatier F, Guillet B et al. A switch toward angiostatic gene expression impairs the angiogenic properties of endothelial progenitor cells in low birth weight preterm infants. *Blood* 2011;118:1699-709.
203. Lucia VC, Luo Z, Gardiner JC, Paneth N, Breslau N. Reports of birthweight by adolescents and their mothers: comparing accuracy and identifying correlates. *PaediatrPerinatEpidemiol* 2006;20:520-7.
204. Sanderson M, Williams MA, White E, et al. Validity and reliability of subject and mother reporting of perinatal factors. *Am J Epidemiol* 1998;147:136-40.
205. Natland ST, Andersen LF, Nilsen TI, Forsmo S, Jacobsen GW. Maternal recall of breastfeeding duration twenty years after delivery. *BMC Med Res Methodol* 2012;12:179.
206. F. Azuaje “Bioinformatics and Biomarker Discovery: "Omic" Data Analysis for Personalized Medicine” ISBN: 978-0-470-74460-4, 2010.
207. AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System). [<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis>].
208. Xia, J., Mandal, R., Sinelnikov, I., Broadhurst, D., and Wishart, D.S. MetaboAnalyst 2.0 - a comprehensive server for metabolomic data analysis . *Nucl. Acids Res* 2012;40:127-133.