



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari

Coordinatore: Prof. Armando Gabrielli

PhD Program in Human Health

Ciclo XXIII

**NUOVI BIOMARCATORI MOLECOLARI
PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA
DELLA SCLEROSI SISTEMICA**

Candidata:

Colomba Fischetti, M.D.

Tutor:

Walter Grassi, Prof.

Anno Accademico 2017/2020

Indice dei contenuti

Abstract

1 Introduzione

1.1. Sclerosi Sistemica	1
1.1.1 Aspetti Generali	1
1.1.2 Eziopatogenesi	2
1.1.3 Ruolo del sistema immunitario	9
1.1.3.1 Profilo autoanticorpale	9
1.1.4 Il recettore del PDGF	16
1.1.4.1 La citochina PDGF	17
1.1.4.2 La struttura del PDGFr	17
1.1.4.3 Ruolo del PDGFr nella Sclerosi Sistemica	18
1.1.4.4 Clonaggio di autoanticorpi anti-PDGF r dai linfociti B memoria di pazienti sclerodermici	21
1.1.4.5 Docking Molecolare	23
1.1.4.6 EPITOPE MAPPING del PDGFR α umano	24
1.1.5 La famiglia dei NOX	26
1.1.6 Varianti cliniche	28
1.1.7 Manifestazioni cliniche	30
1.1.8 Diagnosi	38
1.1.9 Terapia	41

2 Scopo dello studio 48

3 Materiali e Metodi 50

3.1 Test ELISA	50
3.2 Costruzione di una “library peptidica” conformazionale del PDGFR α umano	51
3.3 Costruzione del database	52

3.4	Analisi statistica	54
3.4.1	Il software SAS® (SAS® Institute Inc., Cary, NC, USA)	54
3.4.2	Il test di Wilcoxon-Mann-Whitney	54
3.4.3	Cluster Analysis	55
3.4.4	Analisi delle componenti principali	55
3.4.5	La curva ROC e la determinazione di un valore cut off	55
4	Risultati	57
4.1	Confronto tra il gruppo SSc ed il gruppo controlli (C)	57
4.2	Confronto tra i due sottogruppi lsSSc (G1) e dsSSc (G2) e il gruppo controlli.	61
4.2.1	Confronto tra i due gruppi di pazienti G1 vs G2	61
4.2.2	Confronto tra pazienti dsSSc (G2) e controlli (C)	62
4.2.3	Confronto tra pazienti lsSSc (G1) e controlli (C)	62
4.2.4	Box Plot	62
4.3	Cluster Analysis, analisi delle componenti principali e divisione dei pazienti in sottogruppi.	64
4.4	Determinazione del valore di cut off con curva Roc	71
5	Discussione	78
6	Conclusione	83
7	Bibliografia	85

Abstract

Background: La Sclerosi Sistemica (SSc) è una malattia rara del tessuto connettivo caratterizzata da danno microvascolare; attivazione dei fibroblasti con aumentata produzione di collagene nella cute, vasi sanguigni e organi interni; disregolazione dell'immunità con produzione di autoanticorpi. Importante è stata la scoperta di autoanticorpi che riconoscono e attivano il recettore del PDGF in pazienti SSc ma non nei controlli, inducendo stress ossidativo e deposizione di collagene, suggerendo un loro ruolo attivo nella patogenesi della SSc. Il nostro gruppo di ricerca ha messo a punto tecniche per clonare autoanticorpi monoclonali anti-PDGFR; identificato i diversi epitopi del PDGFR riconosciuti dai vari monoclonali; dimostrato che questi autoanticorpi causano fibrosi in vivo utilizzando un nuovo modello murino.

Materiali e metodi: Utilizzando un saggio ELISA già ottimizzato, sono stati analizzati i sieri di pazienti SSc. 25 dei sieri SSc risultati positivi al test ELISA (13 SSc limitata, 12 SSc diffusa) insieme a 25 sieri controllo sono stati spediti a Pepscan Presto, Lelystat, Olanda, e testati con una Pepscan-based ELISA. E' stata quindi generata una specifica library peptidica per valutare il legame tra gli epitopi conformazionali del PDGFR e gli autoanticorpi presenti nel siero SSc e identificare quali tra questi fossero il bersaglio di una maggiore reattività. Oltre ai 60 peptidi espressione dei primi tre domini della porzione extracellulare del PDGFR, la library contiene anche 60 peptidi rappresentanti la proteina NOX-2 appartenente alla famiglia delle NADPH ossidasi. Secondo la nostra ipotesi, sia la proteina NOX-2 che il PDGFR rappresentano il bersaglio della risposta autoimmunitaria da parte dei pazienti affetti da SSc.

Risultati: E' stata evidenziata una differente reattività dei sieri dei pazienti SSc rispetto ai sieri controllo nei confronti di alcuni peptidi contenuti nella library. Ciò dimostra che i sieri dei pazienti SSc contengono autoanticorpi che riconoscono epitopi conformazionali specifici, ed in particolare 13 di essi appartenenti a NOX2 e 21 al PDGFR. Tra i peptidi che sono risultati statisticamente significativi è poi stato possibile identificarne alcuni che riescono a discriminare in maniera più marcata i pazienti dai controlli e che potrebbero rappresentare in futuro possibili bersagli di test diagnostici epitope-based. Sono stati individuati valori di cut-off, mediante curve Roc, per quei peptidi che si erano dimostrati i migliori a discriminare i pazienti SSc dai controlli, ovvero PEP8 e PEP9 (espressione di NOX), PEP61 e PEP75 (espressione del PDGFR). Dal loro confronto è emerso che il valore cut-off di PEP61 pari a 435 è quello a cui è associata la più alta sensibilità e

Abstract

specificità (se= 68%, sp= 80%). Nonostante una numerosità campionaria troppo esigua per trarre delle conclusioni statisticamente significative, indipendentemente dal punteggio cut off considerato, cinque individui appartenenti al gruppo controlli si posizionino sempre al di sopra del livello soglia, risultando sempre positivi a un ipotetico test diagnostico.

Conclusioni: Con questo lavoro di ricerca, sono stati individuati specifici epitopi conformazionali che rappresentano il sito di legame tra anticorpi anti-PDGFr con i sieri di pazienti SSc. Esiste una diversa reattività dei sieri SSc al recettore del PDGF sulla base della quale è stato possibile fare una suddivisione dei pazienti in sottogruppi in parte diversi rispetto alla tradizionale classificazione (forma diffusa vs limitata). Questo conferma l'attuale difficoltà di classificazione dei malati sclerodermici che dipende dall'estrema variabilità nel decorso della malattia e che suggerisce di applicare il saggio di legame descritto in questo lavoro di tesi in uno studio multicentrico su ampie coorti di pazienti. Una considerazione a parte merita il riscontro che, indipendentemente dal punteggio cut-off considerato, cinque sieri controllo presentano una reattività estremamente elevata per tutti i peptidi della library, con un comportamento paragonabile ai pazienti SSc diffusa. Questo dato, ci fa interrogare se questa polireattività sierica possa essere espressione di una familiarità verso malattie autoimmuni o di una malattia non ancora manifesta. Pertanto in questi pazienti è fondamentale il follow-up clinico per cogliere precocemente i primi segni di malattia. Se queste osservazioni verranno confermate da studi su una più ampia numerosità campionaria, questi peptidi potranno rappresentare il bersaglio di specifici test diagnostici epitope-based, e soprattutto di mirate terapie molecolari.

Introduzione

1.1 Sclerosi Sistemica

1.1.1 Aspetti generali

La sclerosi sistemica (SSc, sclerodermia) è una malattia cronica del tessuto connettivo caratterizzata da tre condizioni che concorrono a determinare i tipici aspetti clinici, strumentali e laboratoristici della malattia ⁽¹⁻²⁾.

- accumulo di collagene e di altri costituenti della matrice extracellulare a carico della cute, vasi sanguigni e di organi interni quali polmone, cuore, rene e tratto gastrointestinale;
- danno microvascolare delle piccole arterie e dei capillari di vari organi ed apparati;
- disregolazione dell'immunità innata ed adattativa.

I dati più recenti indicano una prevalenza variabile tra 50-300 casi per 1.000.000 di abitanti l'anno ed un'incidenza tra 2,3-28,2 per 1.000.000 di abitanti/anno ⁽³⁾.

La SSc è presente in tutto il mondo, sebbene con una certa eterogeneità dal punto di vista della diffusione nelle diverse etnie.

Il sesso femminile è più colpito rispetto a quello maschile (rapporto femmine:maschi = 3:1), in una fascia d'età compresa tra i 30 e i 50 anni ⁽⁴⁾.

1.1.2 Eziopatogenesi

L'eziologia della SSc è ancora sconosciuta. Si ritiene che l'interazione tra fattori genetici e fattori ambientali sia implicata nella patogenesi della sclerodermia peraltro con un meccanismo non ancora chiaro.

Fattori genetici

Sebbene la SSc non sia una malattia a trasmissione mendeliana, in famiglie con una storia di SSc l'incidenza della malattia è aumentata di 1,5 a 1,7 % rispetto ai controlli. Il rischio aumenta di 15-19 volte in fratelli, e di 13-15 volte in parenti di primo grado^(5,6,7). In queste famiglie vi è inoltre anche una probabilità più elevata di sviluppare altre malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico, le miositi, la sindrome di Sjögren o il semplice fenomeno di Raynaud ⁽⁸⁾.

Come altre malattie autoimmuni, anche la sclerodermia è associata con polimorfismi del complesso maggiore di istocompatibilità. Una associazione significativa è stata osservata tra l'HLA DQB1-0501 e la positività per anticorpi anticentromero⁽⁹⁾. Studi su pazienti caucasici hanno inoltre mostrato associazioni tra la presenza di anticorpi anti topoisomerasi I e DRB1 * * 1101- 1104 e HLA-DPB1 * 1301.

Nella popolazione afroamericana solo l'associazione con l'HLA-DQB1 * 0301 (DQw7) è risultata significativamente aumentata. Questi dati suggeriscono che la produzione di anticorpi specifici della sclerodermia è associata con alleli HLA ^(10,11).

Altre informazioni, a questo riguardo, sono venute dai “genome-wide association studies” (GWAS) e dai “candidate gene study” (CGS).

Epigenetica

Negli ultimi anni particolari studi sono stati rivolti al ruolo della epigenetica in quanto meccanismo di adattamento ad agenti ambientali ⁽¹²⁻¹⁵⁾.

L'epigenetica agisce secondo 3 meccanismi principali 1) la metilazione del DNA 2) la modifica post-traduzionale delle proteine istoniche e 3) l'RNA non codificante ^(16,17).

Nei pazienti con sclerosi sistemica, uno studio di metilazione del DNA genome-wide ha mostrato un gran numero di siti CpG con alterazioni della metilazione nei fibroblasti dermici derivati da pazienti sclerodermici sia con forma cutanea limitata che diffusa, dimostrando una significativa correlazione tra lo stato di metilazione del DNA e l'espressione genica nei geni esaminati⁽¹⁸⁾. Due fattori di trascrizione, "Friend leukaemia integration 1" (Fli1) e "Krüppel-like factor 5" (Klf5) capaci di inibire la reazione fibrotica, sono epigeneticamente repressi nei fibroblasti dermici SSc. Il significato patogenetico dell'alterata regolazione di questi due geni è sottolineato dall'osservazione che topi transgenici con delezione di una singola copia di Klf5 e Fli1 sviluppano spontaneamente un fenotipo che riassume tutte e tre le caratteristiche principali della sclerosi sistemica: fibrosi, danno vascolare e attivazione delle cellule B con la produzione di autoanticorpi ⁽¹⁹⁾.

Sono state studiate nei pazienti sclerodermici anche le modificazioni dell'istone post-traduzionale, tra cui acetilazione, deacetilazione e metilazione. Nonostante che i livelli di istone deacetilasi (HDACs) sono stati segnalati essere sia elevati che ridotti, si è visto che l'inibizione farmacologica di HDAC nel wild-type fibroblasti comportato comunque la soppressione delle risposte fibrotiche ^(20,21).

I microRNA (miRNA) sono RNA non codificanti che agiscono come regolatori intracellulari dell'espressione genica. Di particolare interesse nella sclerosi sistemica sono i miR-21 e miR-29, espressi in modo aberrante e che potrebbero contribuire alla patogenesi della malattia. Da un lato, il miR-21, il cui livello è elevato nei fibroblasti attivati, sopprime l'azione anti-fibrotica di SMAD7, promuovendo in tal modo un aumento della fibrosi ⁽²²⁾. Dall'altro lato, il miR-29i è fortemente soppresso in fibroblasti SSc, i suoi livelli sono inferiori in fibroblasti isolati da pazienti con sclerosi sistemica rispetto ai controlli sani in cui è sovraespresso ^(23,24). Gli studi confermano che miR-29a regola direttamente CI. I miRNA possono essere rilevati nella circolazione sanguigna ed esercitare attività biologiche quando incorporati in microvescicole. Anche se resta ancora molto da chiarire sui meccanismi di azione dei miRNA nella sclerosi sistemica, i livelli sierici di questi RNA non codificanti potrebbero essere utilizzati in futuro come biomarcatori e bersagli terapeutici nella SSc.

Fattori ambientali

Poco si sa circa l'ambiente, la dieta e lo stile di vita che potrebbero innescare l'insorgenza della sclerosi sistemica in individui geneticamente predisposti.

Agenti chimici

Sebbene il fumo e l'alcol non siano stati indicati come fattori di rischio di malattia⁽²⁵⁾, le esposizioni professionali ai solventi nei luoghi di lavoro sembrano costituire un fattore di rischio. Già nel 1960 è stata riconosciuta l'associazione tra fenomeno di Raynaud, l'ispessimento cutaneo e l'acrosteolisi dopo esposizione a cloruro di vinile ⁽²⁶⁾.

Già nel 1960 è stata riconosciuta l'associazione tra fenomeno di Raynaud, ispessimento cutaneo e acroosteolisi dopo esposizione a cloruro di vinile ⁽²⁶⁾.

Sulla scorta di queste osservazioni, in una popolazione sufficientemente ampia di pazienti con SSc, sono stati indagati diversi fattori ambientali come potenziali fattori di rischio per lo sviluppo della malattia, tra questi l'associazione più riconosciuta è con l'esposizione a silice cristallina, cloruro di vinile, acquaragia, solventi aromatici, solventi clorurati, tricloroetilene, chetoni e fumi di saldatura⁽²⁷⁾. Inoltre questo aumento del rischio sembra essere maggiore negli uomini indipendentemente dalla dose di esposizione.

Agenti infettivi

Come in altre malattie autoimmuni, gli agenti infettivi sono stati indagati come potenziali trigger ambientali che possono essere coinvolti nella patogenesi della sclerosi sistemica via mimicria molecolare. Una stretta somiglianza di sequenze amminoacidiche tra la topoisomerasi I e un antigene gruppo-specifico di alcuni retrovirus mammiferi⁽²⁸⁾. Più importante la dimostrazione della presenza nel siero di pazienti sclerodermici di anticorpi specifici per la proteina UL94 del citomegalovirus, proteina che ha stretta omologia di sequenza con la proteina NAG-2 espressa sulle cellule endoteliali e complessata con le integrine. Questi anticorpi, inducendo in vitro apoptosi delle cellule endoteliali e stimolando in fibroblasti normali un fenotipo pro-fibrotico, potrebbero rappresentare il nesso causale tra infezione virale e sclerosi sistemica^(29,30). A supporto dell'ipotesi dell'innesco virale c'è da aggiungere che anche l'RNA del virus di Epstein-Barr, un altro membro della famiglia Herpesviridae, è stato trovato in fibroblasti e miofibroblasti all'interno della lesione fibrotica ⁽³¹⁾.

Neoplasie

Sono state identificate alterazioni nel gene che codifica per l'RNA polimerasi III nelle cellule neoplastiche estratte dai tumori di pazienti con SSc e con presenza di anticorpi anti RNA polimerasi III, ma non nei tessuti di controllo degli stessi pazienti e nei tumori di pazienti sclerodermici con altri autoanticorpi. In base a questi dati è stato ipotizzato che la risposta immunitaria indotta dalla mutazione neoplastica perderebbe la specificità e attraverso il meccanismo dell' epitope spreading produrrebbe il fenotipo autoanticorpale. Anticorpi anti RNA polimerase III sono più frequenti nei pazienti SSc con neoplasia e una attenta ricerca di neoplasia andrebbe fatta nei pazienti con esordio recente di malattia positivi per anticorpi anti RNA polimerase III.⁽³²⁻³⁴⁾

Danno endotelio vascolare

Nella sclerosi sistemica il danno endoteliale è una delle prime e più importanti manifestazioni della SSc, alla quale viene ricondotto il fenomeno di Raynaud, le alterazioni microvascolari dei capillari ungueali, e delle ulcere digitali che spesso precedono la fibrosi tissutale ⁽³⁵⁻³⁷⁾ livello degli organi interni (come polmoni, cuore, reni e muscoli) e sono responsabili di sintomi importanti e di manifestazioni cliniche spesso legate a complicanze gravi e mortali ⁽³⁸⁻⁴³⁾.

Le alterazioni morfologiche del letto capillare possono essere visualizzate con la capillaroscopia periungueale⁽⁴⁴⁾ in cui il quadro caratteristico è rappresentato dalla rarefazione della trama capillare con contemporanea dilatazione dei capillari residui, che possono assumere aspetti francamente

teleangectasici (*figura 1*), Altri reperti sono costituiti da microemorragie e da trombi endoluminali⁽⁴⁵⁾. All'indagine istologica le arteriole mostrano ispessimento della media, e deposizione di matrice extracellulare con restringimento del lume.

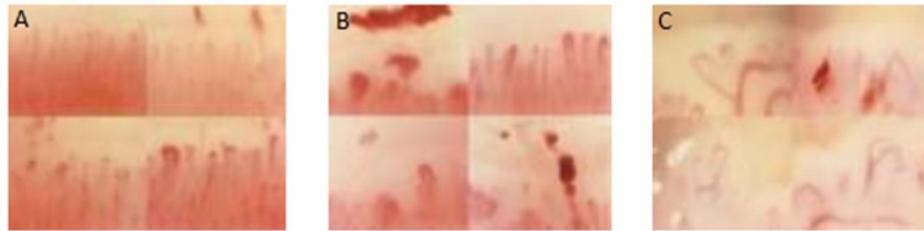


Figura 1 Quadro videocapillaroscopico in corso di sclerodermia.
A: early- scleroderma. **B:** active-scleroderma. **C:** late-scleroderma.

Al danno microcircolatorio vanno anche ricondotte le teleangectasie cutanee e delle mucose^(46,47), la disfunzione erettile derivante da alterazioni del flusso di sangue del pene⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾, la disfunzione cardiaca^(51,52), l'ectasia gastrica vascolare antrale⁽⁵³⁻⁵⁵⁾, l'ipertensione polmonare, la crisi renale sclerodermica e l'ischemia retinica bilaterale^(56,57).

I fattori chiamati in causa per spiegare il danno a carico dell'endotelio sono molteplici, di natura immunologica e non. La possibilità che anticorpi anti-endotelio possano contribuire al danno è stata prospettata ma non confermata. Nella SSc è stata dimostrata una iper-reattività immunitaria nei confronti della membrana basale, soprattutto verso il collagene IV e la laminina^(58,59). Sia anticorpi sia cellule effettrici potrebbero interferire con la normale proliferazione delle cellule endoteliali. Inoltre, nei pazienti sclerodermici è stata dimostrata la presenza di elevate quantità di citochine potenzialmente in grado di danneggiare, direttamente o indirettamente, il

microcircolo (PDGF, IL-1, IL-2, TNF α , leucotriene B4, endotelina 1 e TGF β)⁽⁶⁰⁾. Tra i meccanismi non immunologici di danno endoteliale è stata rivolta particolare attenzione ai radicali liberi dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS) generati dopo ripetuti fenomeni di ischemia-riperfusion secondari al fenomeno di Raynaud⁽⁶¹⁾. Le cellule endoteliali, essendo prive della catalasi⁽⁶²⁾, enzima chiave nel sistema antiossidante intracellulare, sono particolarmente sensibili all'azione tossica di questo radicale dell'ossigeno.

Aspetti fibrotici

L'elemento più tipico della sclerodermia è l'aumentata produzione di matrice extracellulare. Esperimenti di coltura cellulare primaria di fibroblasti ottenuti da biopsie cutanee di pazienti affetti da SSc hanno dimostrato che tali cellule, pur in assenza di stimoli esogeni, hanno una capacità di produrre collagene da 2 a 4 volte maggiore rispetto ai fibroblasti ottenuti da biopsie di cute sana^(63,64).

I fibroblasti SSc presentano dunque alterazioni funzionali e strutturali che conferiscono loro un fenotipo miofibroblastico pro-fibrotico, caratterizzato da aumentata espressione dell'RNA messaggero per l' α -actina del muscolo liscio e per il collagene e dei relativi prodotti proteici, ma non si sa se ciò dipenda da un difetto intrinseco dei fibroblasti, da una reazione a stimoli esterni e da combinazione di entrambi.

I fibroblasti sclerodermici hanno probabilmente una abnorme sensibilità alla stimolazione da parte di diverse citochine pro-infiammatorie quali l'IL-1 α , l'IL-1 β e l'IL-6 che si sono dimostrate capaci di modulare le funzioni dei fibroblasti inducendo fenotipi pro-adesivi e pro-infiammatori⁽⁶⁵⁾.

1.1.3 Ruolo del sistema immunitario

L'eziologia della SSc è ancora sconosciuta. Si ritiene che l'interazione tra fattori genetici e fattori ambientali sia implicata nella patogenesi della sclerodermia peraltro con un meccanismo non ancora chiaro.

1.1.3.1. Profilo autoanticorpale

Nella stragrande maggioranza dei pazienti con SSc è stata documentata la presenza nel siero di autoanticorpi. Più comunemente, questi autoanticorpi sono diretti contro componenti intracellulare⁽⁶⁶⁾ e correlati alle diverse manifestazioni cliniche della patologia come: l'anti-topoisomerasi I (Scl-70), l'anticentromero (ACA), l'anti RNA polimerasi III e l'anticorpo anti endotelio, nel 90% dei pazienti con SSc sono presenti anticorpi anti-nucleo (ANA), la cui presenza però non è patognomonica (*tabella I*).

Autoanticorpo	Pattern di colorazione (ANA test)	Frequenza	Fenotipo clinico	Prognosi
Anticentromero	Speckled discreto	20-38 %	lcSSc Ipertensione arteriosa polmonare Coinvolgimento vascolare periferico severo	Buona
Anti-topoisomerasi I (anti Scl70)	Speckled (con o senza pattern nucleolare)	20-30 %	dcSSc Fibrosi polmonare, coinvolgimento cardiaco Coinvolgimento vascolare periferico	Severa
Anti-RNA polimerasi III	Speckled (con o senza pattern nucleolare)	5-31 %	dcSSc Crisi renale sclerodermica Frizione tendinea, sinoviti, miositi, contratture articolari	Aumento della mortalità
Anti-U3 RNP	Nucleolare	4-10 %	dcSSc Fibrosi polmonare, coinvolgimento cardiaco, Ipertensione arteriosa polmonare Crisi renale sclerodermica, coinvolgimento gastrointestinale	Infausta
Anti- Th/To	Nucleolare	2-5 %	lcSSc Fibrosi polmonare Crisi renale sclerodermica	Infausta
Anti- U11/U12 RNP		3,20%	Fenomeno di Raynaud Fibrosi polmonare Coinvolgimento gastrointestinale	Severa
Anti- PM -Scl	Nucleolare	4-11 %	lcSSc Sindrome da overlap con malattie miste del connettivo Fenomeno di Raunaud, puffy fingers, artriti, miositi	Buona
Anti- U1 RNP	Speckled	2-14%	lcSSc , overlap con polimiositi Fenomeno di Raunaud, artriti, miositi, coinvolgimento polmonare, calcinosi, sindrome secca	Buona

Tabella I. Associazione autoanticorpi SSc correlati, fenotipo clinico e prognosi

Anticorpi Antinucleo (ANA)

Presenti in oltre il 90% dei pazienti sclerodermici. Tra di essi, gli anticorpi anti-centromero (ACA) presenti nel 20-38% dei casi, rappresentano la produzione degli anticorpi anti-nucleo specifica ed esclusiva, spesso indicativa delle caratteristiche cliniche, del decorso e della severità della malattia. Gli ACA insieme agli anticorpi anti-topoisomerasi I (precedentemente definiti come anticorpi anti-Scl 70), rappresentano i markers più utilizzati nella pratica clinica, perché in grado di differenziare i pazienti sclerodermici da quelli affetti da altre connettiviti e dai soggetti sani.

Gli anticorpi anti-centromero (ACA)

La loro frequenza nei pazienti sclerodermici è compresa tra il 20% e il 38%, con variazioni all'interno delle varie popolazioni etniche e a seconda delle caratteristiche genotipiche. Si rinvencono nell' 80-90% dei pazienti con la variante limitata ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾, possono essere presenti nel 10% di casi con forma diffusa. Gli anticorpi anti-centromero comprendono autoanticorpi specifici per sei diverse proteine centromeriche, CENP A-F. La loro presenza nel siero è rivelata dal tipico pattern di colorazione che essi assumono in immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2, mediante Western Blotting o, più recentemente, mediante test ELISA. Il loro titolo è stabile nel tempo e non dipende dall'attività di malattia. Gli anticorpi anti-centromero sono generalmente associati ad un coinvolgimento cutaneo limitato accompagnato da ulcere digitali e calcinosi, a fibrosi polmonare assente o poco importante ma ad un aumentato rischio di sviluppare ipertensione arteriosa polmonare, correlando in definitiva con una prognosi migliore e con un minor tasso di mortalità.

Gli anticorpi anti-Scl 70

Diretti contro l'enzima DNA topoisomerasi-1, si ritrovano solo nel 20-30% dei casi nel siero dei pazienti e sono per lo più correlati ad una forma diffusa di sclerosi sistemica, correlano con una prognosi peggiore della malattia, con una più estesa trasformazione fibrotica polmonare e con un più elevato rischio di crisi renale sclerodermica. La loro presenza è mutuamente esclusiva con la presenza degli anticorpi anti-centromero, sono state osservate variazioni nella prevalenza influenzate dalle differenze etniche e dal genotipo. Gli anticorpi anti-topoisomerasi I vengono determinati mediante immunodiffusione doppia, immunoprecipitazione, Western Blotting o test ELISA, effettuati utilizzando come antigene la topoisomerasi I estratta dal timo di vitello o proteine ricombinanti di fusione. Studi recenti attribuiscono agli anticorpi anti-topoisomerasi I un potenziale ruolo patogenetico. La topoisomerasi I liberata dalle cellule endoteliali apoptotiche sarebbe infatti in grado di legarsi specificamente alla superficie dei fibroblasti, fungendo così da antigene per la produzione di autoanticorpi. Il riconoscimento da parte degli autoanticorpi anti-topoisomerasi I indurrebbe quindi l'adesione e l'attivazione dei monociti, portando allo sviluppo della malattia.

Gli anticorpi anti-RNA polimerasi I e III

Più raramente si riscontrano invece correlabili alle forme di malattia rapidamente progressiva con severo impegno degli organi interni;

Gli anticorpi anti-U3-RNP

Tipici della forma diffusa, detti anche anticorpi antifibrillina poiché il principale autoantigene bersaglio degli anticorpi anti-U3-RNP è la fibrillarina, un componente del complesso ribonucleoproteico nucleolare U3. Mutuamente esclusiva con la presenza degli anticorpi anti-nucleo e degli anticorpi anti-RNA polimerasi, la positività agli anticorpi anti-U3-RNP viene riscontrata nel 4-10% dei pazienti sclerodermici, ma anche in alcuni

pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico. Gli anticorpi anti-U3-RNP sono generalmente associati alla variante diffusa della malattia, ma con caratteristiche cliniche influenzate dal gruppo etnico di appartenenza.

Gli anticorpi anti-U11/U12-RNP

Specificamente diretti contro ribonucleoproteine dello spliceosoma, gli anticorpi anti-U11/U12-RNP si associano a fenomeno di Raynaud, coinvolgimento gastro-intestinale e fibrosi polmonare

Gli anticorpi anti-PM-Scl

Presenti nelle forme ad interessamento muscolare. Inizialmente scoperti nei soggetti con sindrome da overlap polimiosite-sclerosi sistemica, gli anticorpi anti-PM-Scl sono presenti nel 4-11% dei pazienti sclerodermici, predittivi di una forma limitata di malattia.

Anticorpi anti-U1-RNP

Specificamente diretti contro una ribonucleoproteina coinvolta nello splicing degli hnRNA, gli anticorpi anti-U1-RNP sono diffusi nel 90% dei soggetti con patologie autoimmunitarie a carico del tessuto connettivo, ma solo nel 2-14% dei soggetti con sclerosi sistemica. I pazienti sclerodermici positivi agli anticorpi anti-U1-RNP presentano generalmente fenomeno di Raynaud e puffy fingers, artrite e disfunzione esofagea.

Più di recente sono stati segnalati anche autoanticorpi circolanti diretti contro recettori delle cellule di superficie e contro antigeni extracellulari, tra cui anticorpi anti recettore di superficie per l'acetilcolina (recettore muscarinico M3), anticorpi anti recettore del PDGF, anticorpi anti cellule endoteliali e anti fibroblasti, anticorpi anti recettore dell'angiotensina di tipo I e angiotensina II, anticorpi anti recettore dell'endotelina 1 tipo A, metalloproteasi 1 (MMP1) e MMP3, ed anti NAG2^(70,71). Questi autoanticorpi hanno dimostrato, in alcuni studi, di avere potenziali proprietà patogenetiche^(72,73).

Gli anticorpi anti-cellule endoteliali (AECA)

sono stati osservati in una parte significativa di pazienti con un maggiore coinvolgimento vascolare ^(74,75). Inizialmente identificati grazie alla loro capacità di reagire contro antigeni di membrana di cellule HUVEC (Human Umbilical Vascular Endothelial Cells), gli AECA sono indicativi dell'entità del danno vascolare e dell'estensione del coinvolgimento viscerale, essendo presenti nel 23% dei soggetti con fenomeno di Raynaud, nel 44% dei pazienti con sclerosi sistemica limitata e nell'85% dei pazienti con variante diffusa di malattia. Sono in grado di indurre nelle cellule endoteliali un'aumentata espressione di citochine infiammatorie (IL-1, IL-6 e MCP-1) e di molecole di adesione (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 e VCAM-1) coinvolte nella chemotassi dei monociti e dei linfociti T, con attivazione di reazioni di citotossicità anticorpo-mediata e conseguente apoptosi delle cellule stesse. Il ruolo degli anticorpi anti-cellule endoteliali nella patogenesi della Sclerosi Sistemica non è stato tuttavia ancora chiarito.

Gli anticorpi anti-fibroblasti (AFA)

Presenti nel siero sia come IgG che come IgM, sono stati rinvenuti rispettivamente nel 58% e nel 48% dei pazienti affetti dalla forma diffusa di malattia. Questi anticorpi inducono nei fibroblasti umani un aumento dose-dipendente dell'espressione di interleuchina-1, di interleuchina-6 e della molecola di adesione ICAM-1, favorendo un fenotipo proinfiammatorio e pro-adesivo. Attraverso il legame con il recettore di membrana TLR-4, essi sarebbero inoltre in grado di stimolare l'espressione di chemochine a nota azione pro-fibrotica come MCP1/CCL2, con conseguente sintesi di collagene e di metalloproteinasi 1.

Esistono poi anticorpi circolanti diretti contro il cytomegalovirus umano (HCMV)⁽³⁰⁾ che sembrano essere in grado di indurre l'apoptosi di cellule endoteliali in vitro cross-reagendo con il complesso integrina-proteina Nag-2, espressa anche sui fibroblasti. L'anticorpo anti-Nag-2, dopo essersi legato ai fibroblasti, induce la trascrizione di circa 1000 sequenze, tra le quali sono compresi i geni coinvolti nella deposizione della matrice extracellulare ed i geni codificanti i fattori di crescita, chemochine e citochine⁽²⁹⁾.

Una recente scoperta è inoltre quella di una nuova classe anticorpi che riconoscono e attivano il PDGFR (recettore del Platelet-Derived Growth Factor), che stimolano la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e di collagenoe che in vitro inducono il fenotipo sclerodermico in normali fibroblasti umani⁽⁷⁶⁾.

Mediatori implicati nella patogenesi della fibrosi nella Sclerosi Sistemica

TGF beta

Tra tutti i mediatori solubili implicati nella sclerosi sistemica, il TGF β è considerato il principale regolatore della fibrosi, ed anomalie nel segnale TGF β sono ben note nella SSc ⁽⁷⁷⁾. Questa citochina pleiotropica è prodotta da vari tipi di cellule, tra cui fibroblasti, miofibroblasti, linfociti T, monociti, macrofagi e piastrine. Viene sintetizzata come un precursore inattivo complessato ad una TGF β - binding protein latente e depositato all'interno della matrice extracellulare, viene convertito nella sua forma biologicamente attiva da proteasi, integrine, espresse dai fibroblasti ed altre cellule.

L'attivazione del TGF β e le cascate di segnale sono estremamente complesse e comportano molteplici recettori primari ed accessori, nonché varie molecole intracellulari, come segnali intermedi, fattori trascrizionali, coattivatori e repressori.

La via canonica del segnale del TGF β coinvolge la fosforilazione sequenziale del recettore TGF β tipo I (TGFR1, noto anche come ALK5), l'attivazione di trasduttori di segnale citosolico SMAD2-SMAD3, e il loro legame con un elemento di consenso SMAD vincolante trovato nei geni profibrotici TGF β -inducibile. Il percorso SMAD è regolato positivamente e negativamente da vari fattori, tra cui SMAD7, che blocca il segnale SMAD, e il recettore nucleare NR4A1, che promuove la degradazione SMAD7 e modula TGF β signalling ^(78,79).

La risposta fibrotica TGF β può anche essere mediata da EGR1, dal non-receptor tyrosine kinases ABL1 (precedentemente noto come c-ABL) e FAK, e potenziata attraverso l'inattivazione di repressori trascrizionali come la proliferazione dei peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), friend leukaemia integration 1 (FLI1) e i componenti della famiglia Krüppel-like factor (KLF)⁽⁸⁰⁾. Un'altra via di segnale intracellulare del TGF β , coinvolto nella sclerosi sistemica, include MAPK1 e MAPK3 (noti anche come ERK2 e ERK1, rispettivamente), p38, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), AKT e TGF β -activated kinase-1 (TAK). Integrine, ABL1, FAK e altri mediatori TGF β possono tutti essere bersagli selettivi di inibitori farmacologici, rappresentando dei potenziali bersagli terapeutici.

L'interleuchina-6

L'interleuchina-6 (IL-6), rilasciata da macrofagi, dalle cellule B e da altri tipi di cellule, sembra avere un ruolo profibrotico nella sclerosi sistemica in quanto in grado di stimolare direttamente i fibroblasti a rilasciare collagene. Nella fibrosi cutanea sperimentale indotta dalla bleomicina, l'eliminazione diretta di IL-6 o anticorpi anti IL-6 si è dimostrata efficace nell'inibire la fibrosi ⁽⁸¹⁾.

Idrossitriptamina (5HT)

Le piastrine sono una ricca fonte di mediatori profibrotici, i loro granuli oltre a contenere TGF β e PDGF, contengono anche grandi quantità di serotonina [(idrossitriptamina (5HT)]. In condizioni fisiologiche, il danno vascolare attiva le piastrine che rilasciano serotonina ed altri mediatori profibrotici, al fine di assicurare una guarigione efficace e autolimitante della ferita. Nella vasculopatia cronica in corso di SSc, il persistente aumento dei livelli di serotonina perpetuerebbe l'attivazione dei fibroblasti ed il rilascio di matrice extracellulare. Gli effetti profibrotici della serotonina sono mediati esclusivamente attraverso i recettori 5HT $2B$ presenti sui fibroblasti, e questi recettori sono sovraespressi nella SSc, il che suggerisce una maggiore sensibilità dei fibroblasti SSc agli effetti profibrotici della serotonina. Inoltre il legame della serotonina con il recettore 5HT $2B$ porta al rilascio di TGF β , che induce a sua volta il rilascio di collagene. L'attivazione delle piastrine, con conseguente rilascio anche di serotonina faciliterebbe la fibrosi e, sarebbe un ponte tra danno vascolare ed accumulo di matrice extracellulare ⁽⁸²⁾.

1.1.4 Il recettore del PDGF

Il Plated derived growth factor (PDGF) è un importante fattore di crescita derivato dalle piastrine e l'interazione con i suoi recettori sembrano avere un ruolo importante nella patogenesi della fibrosi in SSc. Una sovrapproduzione di PDGF si ritrova anche in altre patologie fibrosanti come la fibrosi polmonare idiopatica, ad opera di macrofagi e dell'epitelio alveolare, nella fibrosi polmonari associata a BOOP (Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia), bronchiolite obliterante post-trapianto, istiocitosi X, pneumoconiosi ed asbestosi.

1.1.4.1. Citochina del PDGR

La citochina PDGF, è un potente mitogeno per le cellule di origine mesenchimale, in particolar modo per i fibroblasti e per le cellule muscolari lisce del tessuto connettivo. Dal punto di vista chimico, è un peptide eterodimerico composto da quattro catene polipeptidiche A, B, C e D, legate tra loro da ponti disolfuro a formare cinque isoforme biologicamente attive: AA, BB, AB, CC e DD. Viene secreto come omodimero (PDGF-AA, PDGF-BB) ma il PDGFA e B possono formare eterodimeri funzionali (PDGF-AB). Esso viene sintetizzato, immagazzinato nei granuli alfa delle piastrine e rilasciato dalle stesse al momento dell'attivazione, ma può essere sintetizzato da molte altre cellule, come le cellule muscolari lisce, i macrofagi attivati, i fibroblasti e le cellule endoteliali ⁽⁸³⁾. Il PDGF, tramite le sue capacità chemiotattiche, è responsabile della migrazione dei fibroblasti, delle cellule muscolari lisce e dei monociti, ed è coinvolto nella riparazione tissutale e nei processi di fibrosi attivando la sintesi di componenti della matrice extracellulare e la secrezione di mediatori profibrotici quali TGF β , monocyte chemoattractant protein-1 e IL-6 ⁽⁸⁴⁾. Appartengono alla famiglia del PDGF altri fattori di crescita quali i fattori di crescita vascolare ed endoteliale B e C (VEGF-B, VEGF-C) attivi nell'angiogenesi e nella crescita delle cellule endoteliali, ed il fattore di crescita placentare (PlGF), anch'esso implicato nella angiogenesi ⁽⁸⁵⁾.

1.1.4.2 La struttura del PDGFr

Il recettore del PDGF appartiene alla famiglia dei recettori tirosin-kinasici. Esso è costituito da due catene, α e/o β , lunghe rispettivamente 1089 amminoacidi e 1106 amminoacidi, che dimerizzano tra loro in seguito al legame con il proprio ligando, dando origine a tre isoforme biologicamente attive: $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, e $\alpha\beta$. Le diverse isoforme del recettore condividono la stessa organizzazione strutturale, essendo costituite da:

- una porzione extracellulare, all'estremità N-terminale, ricca di residui di cisteina e organizzata in cinque domini immunoglobulinici, responsabile dell'interazione con il PDGF
- un dominio transmembrana, formato da 25-30 amminoacidi idrofobici
- una regione intracellulare, all'estremità C-terminale, organizzata in due domini tirosinachinasici separati tra loro da una sequenza di circa 100 amminoacidi.

L'analisi della sequenza amminoacidica del PDGFR α e del PDGFR β umani ha evidenziato una forte omologia tra i due, pari al 44%, con regioni molto conservate, lunghe più di 5 amminoacidi, nella porzione extracellulare, con un'identità di sequenza del 74-87% nel dominio chinasi e con un numero variabile di residui di tirosina, 4 nella catena α e 6 nella catena β , in posizioni identiche all'estremità C-terminale, che rappresentano probabilmente i siti di autofosforilazione del recettore ⁽⁸⁶⁾. I due recettori differiscono per la loro affinità di legame nei confronti dei diversi ligandi: il PDGFR α lega le isoforme AA, BB, AB e CC del PDGF, mentre il PDGFR β lega le isoforme BB, DD e, con minore affinità, l'isoforma AB. I pattern di espressione delle varie isoforme del PDGF e del PDGFR sono diversi nei vari tessuti e i loro livelli di espressione risultano spazio-tempo regolati durante lo sviluppo, in risposta ad una serie di stimoli, in corso di infiammazione e in altre condizioni fisiopatologiche ⁽⁸⁷⁾.

1.1.4.3 Ruolo del PDGFR nella Sclerosi Sistemica

Il recettore del PDGF risulta essere iperespresso sia nella cute ⁽⁸⁸⁾ che nei fibroblasti ⁽⁸⁹⁾ dei pazienti sclerodermici, ed è responsabile di una produzione eccessiva di radicali liberi. E questo rende il suo ruolo determinante nella patogenesi della Sclerosi Sistemica. Recentemente, autoanticorpi stimolanti il recettore del PDGF sono stati identificati nel siero dei pazienti con SSc. Questi anticorpi attivano la cascata Ha-Ras-ERK 1/2, che porta alla

generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), seguita da un aumento della sintesi di molecole della matrice extracellulare ed inducono il fenotipo sclerodermico in fibroblasti normali ⁽⁹⁰⁾. (figura 2). Da sottolineare il fatto che l'azione degli anticorpi anti-PDGFR non è quantitativamente comparabile a quella del PDGF poiché quest'ultimo ha effetti biologici sulla cascata Ha-Ras/ROS solo per 15 minuti circa, mentre l'attivazione indotta dagli anticorpi è più protratta. Questo circuito, che nella SSc sembra automantenersi, conduce all'interno della cellula fibroblastica a eccessiva produzione di collagene di tipo I, danno al DNA ed aumentata senescenza cellulare ⁽⁹¹⁾. Appare quindi chiaro che l'eccessiva produzione di radicali liberi dell'ossigeno intracellulare conduce a modificazioni tali da instaurare uno stato profibrotico.

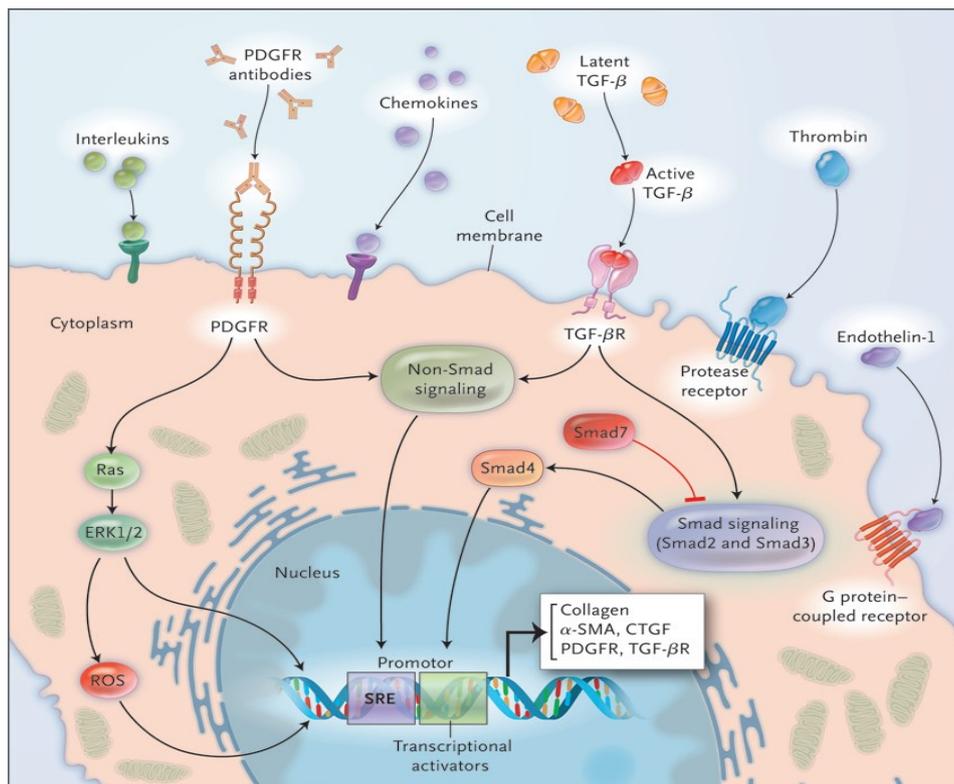


Figura 2. Attivazione dei fibroblasti in corso di sclerosi sistemica

Il nostro gruppo di ricerca guidato dal Prof. Armando Gabrielli ha dimostrato la presenza nel siero di pazienti sclerodermici di autoanticorpi anti-recettore del PDGF58 che, a differenza degli autoanticorpi precedentemente descritti, sono dotati di attività biologica, potendo così contribuire alla patogenesi della malattia. Tali anticorpi, legando il PDGFR presente sulla superficie cellulare dei fibroblasti, sono in grado di innescare una cascata intracellulare che, attraverso l'attivazione delle proteine Ha-Ras, ERK1/2 e NADPH ossidasi, induce un'iperproduzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e, successivamente, un aumento della sintesi di collagene di tipo I e di α -actina del muscolo liscio (*figura 3*)⁽⁹²⁾. Questo meccanismo può spiegare l'eccessivo stress ossidativo e l'eccessiva produzione di collagene, caratteristiche salienti del fenotipo dei fibroblasti in corso di malattia sclerodermica. L'accumulo intracellulare di elevate quantità di ROS condurrebbe infatti a modificazioni tali da indurre nel fibroblasto sclerodermico uno stato profibrotico caratterizzato da una vivace attività proliferativa, da un'aumentata attività trascrizionale dei geni del collagene, da danno al DNA e da un'aumentata senescenza cellulare⁽⁹³⁾. I ROS agirebbero come secondi messaggeri, stimolando l'attivazione dei promotori di geni del collagene di tipo I e dell'actina del muscolo liscio e automantenendo il circuito intracellulare che porta alla loro produzione indipendentemente dallo stimolo esogeno che li ha generati.

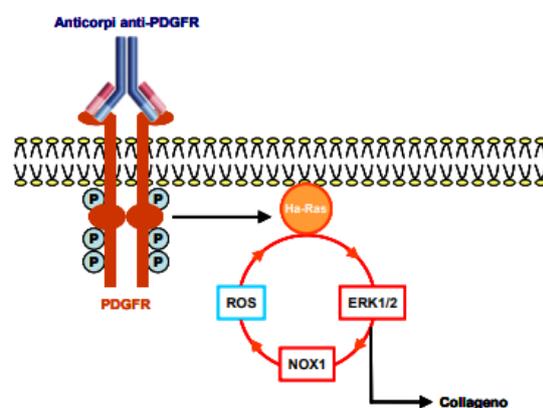


Figura 3. Segnale intracellulare indotto dagli anticorpi anti-recettore del PDGF

Topi transgenici che esprimono una PDGF receptor- α (PDGFR α) costitutivamente attivo sviluppano fibrosi in più organi ⁽⁹⁴⁾. Fibroblasti provenienti da biopsie di cute di pazienti con sclerosi sistemica costitutivamente producono ROS, che potrebbe contribuire direttamente alla fibrosi persistente attraverso il danno al DNA ed l'amplificazione autocrina di TGF β , ma anche attraverso una risposta fibrotica WNT-mediata da queste cellule ⁽⁹⁵⁾ suggerendo che il blocco terapeutico del segnale di Wnt potrebbe essere un possibile approccio terapeutico.

1.1.4.4 Clonaggio di autoanticorpi anti-PDGFR dai linfociti B memoria di pazienti sclerodermici

Un precedente lavoro del nostro gruppo di ricerca ha portato all'isolamento e all'immortalizzazione di linfociti B memoria di pazienti sclerodermici. Sono stati dunque selezionati i cloni linfocitari autoreattivi nei confronti del PDGFR umano. L'analisi del repertorio immunitario di tali cloni ha messo in luce la presenza di alcune sequenze immunoglobuliniche del tutto originali, in quanto non presenti nelle banche dati attualmente disponibili. Queste sequenze sono state ingegnerizzate in un opportuno vettore di espressione che consente la produzione di IgG umane intere in cellule eucariotiche.

E' stato quindi ottenuto un pannello di IgG monoclonali umane ⁽⁹⁶⁾ la cui reattività nei confronti del PDGFR è stata caratterizzata sia mediante saggi di legame che mediante saggi funzionali (*figura 4*).

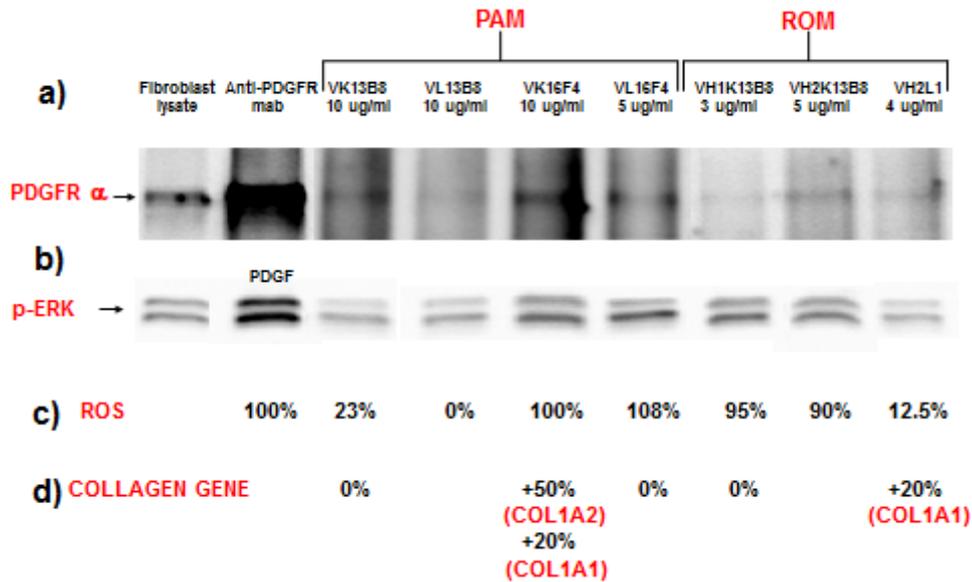


Figura 4. Caratterizzazione del pannello di anticorpi monoclonali ricombinanti anti PDGFR umano

A) Immunoprecipitazione del PDGFRα da lisato di fibroblasti umani primari, a confronto con un anticorpo commerciale di coniglio anti-PDGFRα umano.

Stimolazione di fibroblasti umani:

B) induzione della fosforilazione di ERK1/2 (pERK1/2) a confronto con il PDGF-BB

C) produzione di ROS, espressa in percentuale rispetto al valore di riferimento ottenuto con la citochina PDGF-BB

D) aumento dell'espressione dei geni del collagene, espressa in percentuale rispetto alla produzione basale nei fibroblasti umani primari in coltura

Quattro sono in definitiva gli anticorpi monoclonali degni di particolare attenzione.

- ✓ **VHPAM-Vκ16F4**: capace sia di legare che di stimolare il PDGFR, con produzione di ROS e aumentare la trascrizione di geni per il collagene I
- ✓ **VHPAM-Vκ13B8**: capace di legare il recettore ma privo di attività stimolatoria
- ✓ **VHPAM-Vλ13B8**: incapace sia di legare che di stimolare il PDGFR
- ✓ **VHPAM-Vλ16F4**: capace di legare il recettore e indurre la produzione di ROS

E' interessante notare come questi anticorpi, pur possedendo caratteristiche funzionali diverse, strutturalmente differiscano tra loro unicamente per la regione variabile delle catene leggere.

1.1.4.5 Docking molecolare

Lo scopo del docking molecolare è quello di valutare le possibili geometrie di legame di un ligando, reale o fittizio, con una molecola di cui è nota la struttura tridimensionale. Queste geometrie di legame comprendono sia il posizionamento del ligando al relativo recettore che lo stato, o gli stati, conformazionali del ligando e del recettore. In definitiva, la caratteristica essenziale di ogni simulazione dell'interazione ligando-recettore è la stima corretta dell'energia libera di legame. Per analizzare queste simulazioni sono naturalmente necessari metodi ed algoritmi di docking automatizzati. Questi metodi possono essere classificati in base a due approcci generali e differenti: il primo considera uno studio a livello geometrico che applica essenzialmente regole euristiche combinatoriali mentre il secondo prevede uno studio a livello energetico che compie allineamenti dei ligandi tramite la minimizzazione dell'energia di interazione ligando-recettore utilizzando vari tipi di algoritmi. Possono anche essere considerate le flessibilità delle specie coinvolte, determinando quindi la velocità dell'analisi (anche in base alla grandezza dei partner), ponendo più o meno fisse le posizioni degli atomi: docking rigido (atomi del ligando e del recettore fissi), docking semi-rigido (atomi del ligando mobili) e docking flessibile (tutti gli atomi mobili). Il docking molecolare rigido tra gli anticorpi e il recettore è stato effettuato caricando i file ottenuti della modellazione per omologia sul server ClusPro 2.0 e impostando i seguenti parametri: gli anticorpi caricati come "ligando", il recettore per il fattore di crescita piastrinico caricato come "recettore", DOT 1.0 come programma di docking, un raggio per il cluster di 5Å, un computo elettrostatico di 1.500 e 20 strutture risultanti finali.

1.1.4.6 Epitope Mapping del PDGFR α umano

Nello stesso studio in cui sono state descritte le IgG monoclonali ⁽⁹⁶⁾, è stata ricostruita mediante modellazione per omologia la struttura tridimensionale della regione extracellulare del PDGFR α umano e del frammento legante

l'antigene delle diverse IgG monoclonali ricombinanti prodotte. Poi, attraverso la metodica del “*molecular docking*”, è stato possibile predire la probabilità statistica di tali complessi macromolecolari di interagire tra loro e con quali epitopi. Il docking molecolare dei complessi PDGFR α umano-anticorpi monoclonali ricombinanti ha prodotto una serie di modelli biostatistici (*figura 5*) che predicono l'interazione, con un'elevata probabilità, tra:

- il ligando naturale PDGF-BB e un epitopo discontinuo compreso tra il secondo e il terzo dominio extracellulare del PDGFR α umano, come preannunciato dalla letteratura scientifica,
- l'autoanticorpo VHPAM-V κ 13B8 e un epitopo compreso tra il primo e il secondo dominio extracellulare del PDGFR α umano,
- l'autoanticorpo VHPAM-V κ 16F4 e un epitopo del PDGFR α umano sovrapponibile a quello del PDGF-BB,
- l'autoanticorpo VHPAM-V λ 16F4 e un epitopo compreso tra il primo e il secondo dominio extracellulare del PDGFR α umano, distinto da quello riconosciuto dal VHPAM- V κ 13B8.

L'identificazione delle regioni del recettore specificamente coinvolte nel legame con i diversi autoanticorpi ha portato alla creazione di una “library peptidica” conformazionale che copre i primi tre domini immunoglobulinici della porzione extracellulare del PDGFR α umano. Al fine di confermare i dati predittivi in silico con più robusti saggi di legame in vitro, tale library peptidica è stata poi testata con i tre anticorpi monoclonali reattivi nei confronti del recettore. I risultati di questo screening hanno mostrato una rilevante corrispondenza tra gli epitopi del PDGFR α suggeriti dalle previsioni in silico e quelli effettivamente riconosciuti in vitro dagli anticorpi monoclonali umani ricombinanti, in particolar modo nel caso del VHPAM-V κ 16F4, e dal ligando naturale PDGF-BB (*figura 5*).

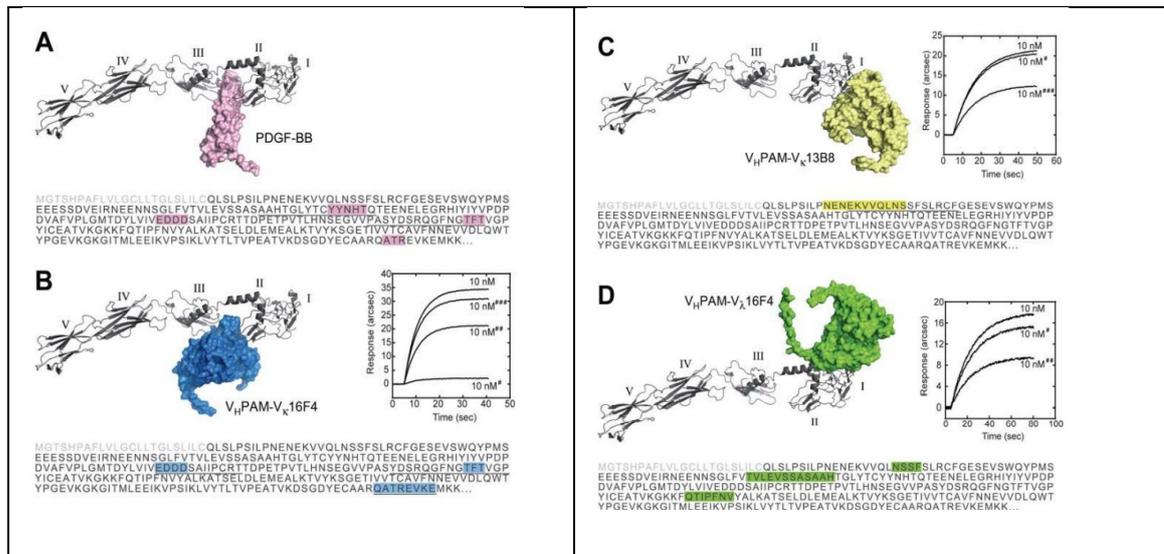


Figura 5. Epitope mapping del PDGFR umano. I seguenti modelli di molecular docking mostrano il legame di PDGF-BB (A) e dei frammenti Fab degli autoanticorpi monoclonali umani VHPAM-V κ 16F4 (B), VHPAM-V κ 13B8 (C), e VHPAM-V λ 16F4 (D) alla porzione extracellulare del PDGFR α umano, che comprende i 5 domini immunoglobulinici (indicati con I-V dalla porzione N- alla C-terminale). Al di sotto di ciascun modello viene mostrata la sequenza amminoacidica dei primi 3 domini extracellulari del PDGFR α . Lungo tale sequenza, gli aminoacidi che compongono i siti di legame previsti al docking molecolare per PDGF-BB, VHPAM-V κ 16F4, VHPAM-V κ 13B8 e VHPAM-V λ 16F4 sono evidenziati tramite colori (rispettivamente rosa, blu, giallo e verde), mentre sono sottolineati i siti di legame identificati nella library peptidica del PDGFR α . Gli inserti in B-D mostrano le curve di legame degli autoanticorpi umani ricombinanti al PDGFR umano.

L'anticorpo VHPAM-V λ 16F4 ha rappresentato l'unica eccezione, in quanto non si è mostrato in grado di legare alcun peptide, probabilmente a causa di una rappresentazione incompleta del suo epitopo conformazionale nella library. Per quanto riguarda l'anticorpo VHPAM-V κ 13B8 è stato identificato un singolo peptide comprendente otto residui aminoacidici corrispondenti a quelli previsti dal molecular docking (figura 6).

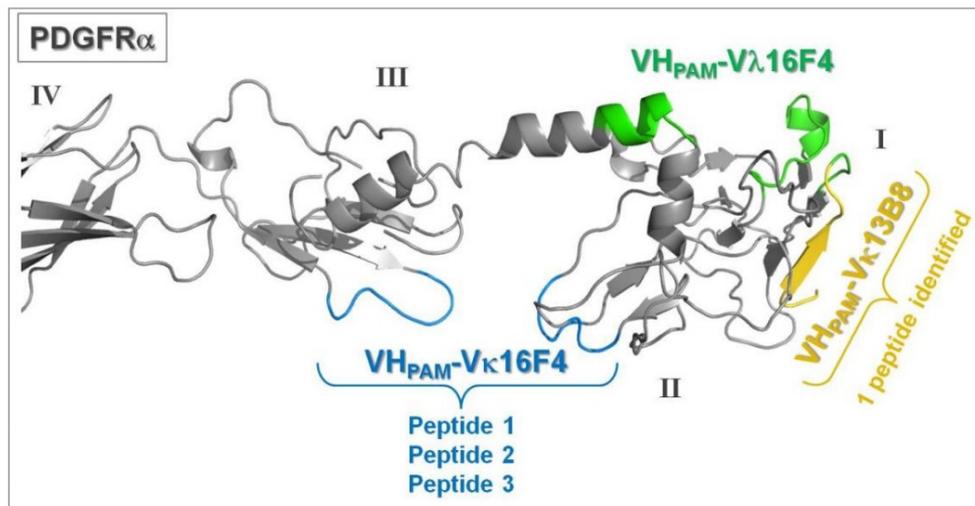


Figura 6. La struttura del PDGFR α è stata disegnata in grigio, mentre a colori sono mostrati gli epitopi recettoriali degli anticorpi monoclonali umani predetti dal docking molecolare. Per VH_{PAM} V λ 16F4 sono stati identificati tre siti di legame, per VH_{PAM} V λ 13B8 uno soltanto.

1.1.5 La famiglia delle NOX

L'ipotesi che la generazione di una grande quantità di specie reattive dell'ossigeno sia importante per la patogenesi della sclerodermia⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾, nel corso degli anni, è stata avvalorata da diversi studi che hanno evidenziato la presenza di un anomalo stress ossidativo nei pazienti affetti sclerodermia⁽⁹²⁾. Il più importante complesso enzimatico responsabile di produzione di ROS è rappresentato dalla NADPH ossidasi (NOXS). La famiglia delle NOX è composta da Nox1, Nox2 (detta gp91phox), Nox 3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2, tutte proteine che sono presenti sia in cellule fagocitarie che non fagocitiche. Nox1 è espressa nelle cellule endoteliali, nelle cellule muscolari lisce vascolari e nelle cellule epiteliali del colon. Nox2 si trova prevalentemente nei fagociti, ma anche nella parete dei vasi e a livello renale e neurale. Nox3 è essenziale per la normale funzione vestibolare e il suo sito di espressione primaria è l'orecchio. Nox4 si presenta sia nel sistema vascolare che nei fibroblasti e negli osteoclasti. Nox5 si trova nei

testicoli e nei tessuti linfoidei, ma anche nelle cellule vascolari. Infine, Duox1 e Duox2 sono entrambi espressi nella tiroide ma, mentre l'espressione di Duox1 è in qualche modo limitata a polmone, pancreas, placenta, prostata e testicoli, l'espressione di Duox2 è più diffusa ⁽¹⁰⁰⁾.

Le NOX si attivano in risposta a stimoli fisici (stiramento, pressione), a fattori di crescita (PDGF, NFG, FGF, TGFB), a citochine (TNF, IL1), a fattori metabolici (iperglicemia, iperinsulinemia, prodotti finali della glicazione, acidi grassi liberi) e agli agonisti dei recettori accoppiati alla proteina G (serotonina, trombina, endotelina, angiotensina II, bradichinina). In particolare, è stato osservato che i processi d'infiammazione, ischemia o ipossia, sono caratterizzati da un significativo aumento della produzione dei ROS attraverso l'attivazione della NADPH ossidasi. L'attivazione della NADPH ossidasi nelle cellule muscolari lisce e nei fibroblasti, sembrerebbe ricoprire un ruolo fondamentale nel determinare lo sviluppo di eventi quali l'ipertensione polmonare, la crisi renale sclerodermica e la fibrosi cutanea nei pazienti sclerodermici. A livello dei vasi sanguigni agenti biologici, quali anticorpi agonisti anti-PDGFr, fattori meccanici e di danno, porterebbero alla generazione di radicali liberi da parte di macrofagi, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce ⁽¹⁰¹⁾. L'aumento dei ROS che ne consegue andrebbe a compromettere il tono vascolare, causando migrazione e proliferazione di cellule muscolari lisce, e apoptosi endoteliale: tutte alterazioni rilevabili nella microcircolazione di pazienti sclerodermici ⁽¹⁾.

1.1.6 Varianti cliniche

In relazione all'estensione del coinvolgimento cutaneo sono state individuate varianti distinte di sclerosi sistemica⁽²⁾: una forma limitata (lSSc), una forma diffusa (dSSc) ed una forma sine sclerodermia. A queste forme si associano altre varianti non ancora ben caratterizzate e non associate a danno microvascolare ed alterazioni immunologiche: si tratta della morfea, che si presenta con placche di irrigidimento cutaneo singole o multiple, e della sclerodermia lineare, che interessa una estremità o il volto.

Sclerosi sistemica limitata

Si presenta come sclerosi cutanea simmetrica distalmente ai gomiti e alle ginocchia, la presenza del fenomeno di Raynaud può precedere anche di alcuni anni la comparsa della malattia. Da un punto di vista sierologico si caratterizza per la positività nel 70-80% dei pazienti degli anticorpi anti-centromero, mentre alla capillaroscopia si evidenziano dilatazioni delle anse capillari, i cosiddetti “megacapillari” in assenza di perdita degli stessi. Generalmente questa forma “limitata” ha una prognosi migliore, salvo una piccola percentuale di casi compresa tra il 10 e il 15% che, dopo un periodo di tempo variabile, sviluppa ipertensione arteriosa polmonare primitiva, in associazione o meno a pneumopatia interstiziale diffusa.

All'interno della forma limitata veniva compresa la sindrome CREST (Calcinosi, Raynaud, disfunzione esofagea, Sclerodattilia, Teleangectasie), sebbene questo acronimo sta andando in disuso per il fatto che la suddetta sindrome è difficilmente inquadrabile all'interno di questo sottogruppo o di altri⁽¹⁾.

Sclerosi sistemica diffusa

Caratterizzata da un coinvolgimento rapido e simmetrico della cute del tronco e degli arti prossimalmente a gomiti e ginocchia, con precoce e grave interessamento viscerale. In questa forma, diversamente che in quella limitata, la comparsa del fenomeno di Raynaud è generalmente contemporanea alle altre manifestazioni cliniche e la prognosi è peggiore. Caratteristica è la presenza di positività degli anticorpi anti Scl70 ed il riscontro capillaroscopico di dilatazione e rarefazione dei capillari periungueali

Sclerosi sistemica sine scleroderma

Caratterizzata da variabile coinvolgimento viscerale in assenza di sclerosi cutanea. In tale variante il fenomeno di Raynaud può essere più o meno presente e la sierologia immunitaria può risultare positiva sia per Ab anti-Scl70 sia per Ab anti-centromero.

Early scleroderma

Negli ultimi anni è stato introdotto il concetto di *early scleroderma* (sclerodermia precoce), che riconosce i seguenti criteri diagnostici:

- 1) presenza di fenomeno di Raynaud;
- 2) presenza di “puffy fingers” (dita paffute);
- 3) assenza di coinvolgimento d’organo;
- 4) presenza o meno di alterazioni capillaroscopiche compatibili con scleroderma pattern;
- 5) presenza di positività di almeno uno degli anticorpi marcatori (anti-centromero o anti Scl-70) ⁽¹⁰²⁾.

Condizioni simil-sclerodermiche

Molte sono le condizioni simil-sclerodermiche che entrano in diagnosi differenziale con la SSc: esistono forme di sclerodermia localizzata come la morfea, che si presenta con aree sparse di indurimento cutaneo o la sclerodermia localizzata, nella quale vi è un'unica area interessata al volto (lesione a colpo di sciabola) od ad un arto. Altre lesioni simil-sclerodermiche sono conseguenza dell'esposizione a sostanza chimiche quali polvere di silice, cloruro di vinile o farmaci come la bleomicina; anche la Graft Versus Host Disease cronica può comparire con aspetto sclerodermico. Infine sono presenti altre lesioni, ad eziologia per lo più sconosciuta, come la sindrome eosinofilia-mialgia, la fascite eosinofila e lo scleroderma post-infettivo di Bùschke.

Sindromi da sovrapposizione

Non di rado la Sclerosi Sistemica si associa ad altre forme di patologie autoimmuni come il Lupus Eritematoso sistemico, l'Artrite Reumatoide, la Sindrome di Sjögren, la Sindrome da anticorpi antifosfolipidi ed altre, in queste forme di sovrapposizione parliamo più propriamente di overlap.

1.1.7 Manifestazioni cliniche

Nella maggior parte dei casi il sintomo di esordio della sclerosi sistemica è rappresentato dal fenomeno di Raynaud. Più raramente, la prima manifestazione è data dal coinvolgimento viscerale, con comparsa di dispnea da sforzo e disturbi esofagei.

Fenomeno di Raynaud

Descritto da Maurice Raynaud è caratterizzato da un vasospasmo parossistico delle arteriole scatenato dal freddo, dalle vibrazioni o da stati emotivi. Le dita delle mani rappresentano il sito d'elezione di questo fenomeno che può comunque riguardare anche altre zone generalmente esposte come le dita dei piedi, la punta del naso o il padiglione auricolare. E' presente nel 95% dei pazienti affetti da SSc, e spesso è il primo sintomo di esordio che può precedere di anni i sintomi veri e propri di malattia. La manifestazione clinica è trifasica, caratterizzata da: *ischemia e pallore* seguite da *cianosi* ed infine da *iperemia* dovuta alla rivascolarizzazione, sebbene sia raro apprezzare tutte le diverse fasi. Può inoltre essere presente dolore, torpore e parestesie. Tale fenomeno, a lungo termine, può determinare la comparsa di ulcere acrali e necrosi cutanea (*figura 7*)



Figura 7. Fenomeno di Raynaud

Manifestazioni cutanee

Nella storia naturale della malattia si distinguono classicamente tre fasi, sebbene esse abbiano limiti sfumati.

Nelle fasi precoci della malattia la cute delle mani e degli avambracci è colpita da un edema simmetrico, duro talvolta associato ad eritema. A livello delle dita delle mani questo fenomeno prende il nome di “*puffy fingers*” o “dita a salsicciotto” per via dell’aspetto particolarmente tozzo che assumono. Questa fase lascia spazio, dopo un periodo di settimane o mesi, alla *fase fibrotica*, in cui si assiste ad un progressivo ispessimento cutaneo; la cute diventa inoltre lucida, tesa, intensamente pigmentata e tendini ed articolazioni. In questa fase infatti le dita assumono un caratteristico atteggiamento in flessione “*dita ad artiglio*” e possono comparire ulcere a livello delle prominenze ossee delle superfici estensorie e artromialgie. Si assiste inoltre alla scomparsa delle rughe, dei peli, della sudorazione e delle secrezioni sebacee. Nel corso della malattia possono comparire tipiche *discromie* o aree di depigmentazione. Poiché nelle zone perifollicolari la perdita di pigmento è risparmiata, la cute assume spesso un aspetto a “sale e pepe”. Possono inoltre comparire *calcificazioni intra e sottocutanee* che si localizzano preferibilmente a livello dei polpastrelli delle dita, lungo la superficie estensoria degli avambracci, a livello della borsa olecranica e nell'area attorno alla patella. Il paziente assume la tipica “*facies sclerodermica*”, caratterizzata da microstomia, labbra fini, raggrinzite, cute tesa ed anelastica, perdita delle rughe e della mimica facciale; frequenti sono anche teleangectasie al volto. A distanza di anni, nella fase finale della malattia, la cute può tornare ad ammorbidirsi e assume un aspetto sottile e atrofico.

Le caratteristiche istopatologiche osservate nella cute sclerodermica dipendono in misura significativa dal fatto che la lesione sia precoce o tardiva. Nella fibrosi precoce, anomalie microvascolari, edema e infiltrati infiammatori perivascolari composti da linfociti e monociti predominano nel

derma papillare e reticolare. Nelle fasi successive della malattia le lesioni sono caratterizzate da accumulo eccessivo dei componenti della matrice extracellulare, obliterazione e perdita del microcircolo, atrofia di annessi cutanei tra cui le ghiandole sudoripare acrine. Le analisi biochimiche di campioni bioptici di cute colpita dimostrano un aumentato accumulo di collagene tipo I e III, e comparsa di collagene tipo VII. Inoltre, la cute sclerodermica presenta abbondante fibronectina, proteoglicani, fibrillina e fibrille di elastina.

Manifestazioni muscolo-scheletriche

Possono comparire artromialgie secondarie all'atteggiamento viziato in flessione delle mani e all'incarceramento di tendini e legamenti da parte del tessuto fibroso sottocutaneo, apprezzabile clinicamente come sfregamenti tendinei. Raramente si sviluppa una franca artrite, prevalente nei pazienti che presentano una connettivite da overlap (SSc + Artrite Reumatoide). L'alterazione ossea più caratteristica nel paziente sclerodermico è l'osteolisi della falange distale delle dita delle mani.

Manifestazioni polmonari

La localizzazione polmonare di malattia è una delle più frequenti in corso di sclerosi sistemica, verificandosi in più del 70% dei casi, e si è dimostrata essere la causa di morte principale in questi pazienti. Il sintomo più comunemente riferito è la dispnea da sforzo, spesso accompagnata da tosse cronica stizzosa, tipico è il riscontro di rantoli crepitanti teleinspiratori alle

basi polmonari. La fibrosi polmonare rende conto anche del quadro respiratorio di tipo restrittivo evidenziabile alla spirometria, così come della ridotta diffusione del CO. La malattia polmonare può essere osservata anche all'imaging, tramite High Resolution Computed Tomography (HRCT) che mostra nelle fasi precoci un quadro "ground glass" o "**a vetro smerigliato**", indicativo di alveolite con presenza di anomalie sub pleuriche distribuite in modo simmetrico, opacità a vetro smerigliato combinato con opacità irregolari lineari o reticolari e micro noduli sparsi (*figura 8a*), i lobi polmonari inferiori sono i più coinvolti. La lesione istologica caratteristica è la **NSIP** "*non-specific interstitial pneumonia* " caratterizzata da un quadro di infiammazione moderata e di fibrosi interstiziale uniforme con ispessimento dei setti alveolari. Meno comunemente, i pazienti con sclerodermia presentano un quadro istologico di **UIP** "usual interstitial pneumonia" caratterizzata da sparsi focolai fibroblastici e fibrosi distribuita in modo non uniforme. In questo tipo di lesione il quadro radiologico HRCT è rappresentato da: opacità reticolari sub pleuriche, honey combing macrocistico e bronchiectasie da trazione (*figura 8b*). Questa triade di segni altamente suggestivo per UIP ha un caratteristico gradiente di distribuzione apico-basale, in cui le opacità reticolari sub pleuriche aumentano dagli apici alle basi dei polmoni. Quest'ultima condizione rappresenta una fase terminale irreversibile di fibrosi polmonare, definito alla HRCT come "honey combing" o polmone "**a nido d'ape**".

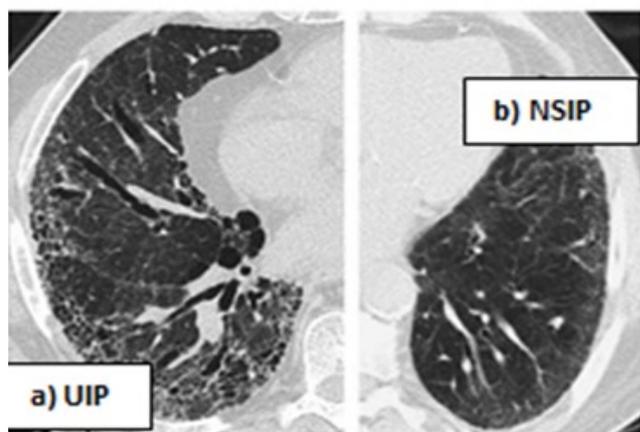


Figura 8 confronto di immagini HRTC tra UIP e NSIP

a) eUIP è caratterizzato da lesioni eterogenee del polmone, che consistono in honeycombing subpleurici, opacità e bronchiectasie da trazione.

b) eNSIP è caratterizzata da un coinvolgimento polmonare omogeneo con prevalenza di opacità a vetro smerigliato combinato con opacità lineari subpleuriche e micro noduli.

Un'entità clinica distinta dalla precedente, ad esclusivo appannaggio della forma limitata (meno del 10% dopo un periodo di tempo variabile dalla diagnosi), è rappresentata dall'ipertensione polmonare primitiva (PAH) con cuore polmonare cronico ed insufficienza cardiaca destra finale, anche in assenza di fibrosi polmonare. Questi pazienti presentano un rapido peggioramento della dispnea e della qualità di vita, con elevata mortalità. In questa fase terminale l'unica possibilità è il trapianto polmonare.

Manifestazioni gastroenteriche

La maggior parte dei pazienti affetti da SSc presenta manifestazioni gastrointestinali già nei primi anni di malattia. La prevalenza dell'interessamento esofageo è altissima (90% circa) sia nella variante limitata che nella variante diffusa di malattia. I principali sintomi sono pirosi retrosternale e rigurgito, secondari a reflusso gastro-esofageo, disfagia da rallentata motilità, in particolare per i cibi solidi. La principale alterazione alla base di ciò è la riduzione o la scomparsa della peristalsi del terzo distale dell'esofago, sia a causa di un deficit della trasmissione

neuromuscolare sia per la progressiva perdita di tono dello sfintere esofageo inferiore, con conseguente acalasia. Queste alterazioni possono essere evidenziate mediante esofago-gastro-duodenoscopia (EGDS), studio videofluoroscopico delle prime vie digestive e mediante manometria esofagea. Durante il corso della malattia, l'intero tratto gastrointestinale può essere interessato, mostrando lesioni fibrotiche nella lamina propria, nella sottomucosa e soprattutto negli strati muscolari lisci insieme ad atrofia della cellula muscolare. L'intestino risulta essere coinvolto in un numero minore di casi; l'interessamento del tenue è causa di gonfiore e dolore addominale, oltre che della comparsa di una sindrome da malassorbimento. Ciò è dovuto a eccessiva crescita batterica nell'intestino atonico e ostruzione dei vasi linfatici da parte della fibrosi. A livello dell'intestino crasso i disturbi principali possono essere stipsi cronica, formazione di fecalomi con episodi di ostruzione intestinale e diverticolosi.

Manifestazioni cardiache

Studi biopatici dimostrano che il cuore è frequentemente interessato in corso di SSc. Patogeneticamente, bisogna distinguere tra un coinvolgimento primitivo del pericardio, miocardio o delle arterie coronariche intramiocardiche da parte di tessuto fibrotico, da un coinvolgimento cardiaco secondario a pneumopatia infiltrativa diffusa o ipertensione arteriosa polmonare. La sostituzione del tessuto miocardico e/o del tessuto di conduzione da parte di tessuto fibroso può determinare cardiomiopatia di tipo restrittivo, blocchi di conduzione, aritmie. La cardiomiopatia sclerodermica si associa ad elevata mortalità. Dei decessi SSc-correlati, il 26% è stato attribuito a cause cardiache, soprattutto secondarie a scompenso cardiaco e aritmie.

Coinvolgimento renale

Il coinvolgimento renale è raro in corso di SSc ed è quasi esclusivo dei pazienti con malattia diffusa e rapida progressione cutanea. Il 20% di questi pazienti viene colpito da una complicanza molto grave, denominata crisi renale sclerodermica, caratterizzata dal rapido instaurarsi di emergenza ipertensiva seguita immediatamente da insufficienza renale acuta rapidamente progressiva. Fattori predittivi sono la forma diffusa di malattia, gli stati iniziali, un rapido peggioramento dell'ispessimento cutaneo, un'anemizzazione di recente insorgenza e manifestazioni vascolari quali insufficienza cardiaca o versamento pericardico. Il quadro clinico e laboratoristico è caratterizzato da incremento notevole della pressione arteriosa (10% circa delle crisi renali sono però normotensive), comparsa di insufficienza renale acuta, raddoppio dell'attività reninica plasmatica, anemia emolitica microangiopatica, piastrinopenia ed insufficienza cardiaca.

Altre manifestazioni

Nei pazienti affetti da SSc è possibile riscontrare xerostomia e/o xeroftalmia, oltre che altre condizioni autoimmunitarie come l'ipotiroidismo o la cirrosi biliare primitiva. Dal punto di vista laboratoristico è presente una sindrome biologica da flogosi con aumento della VES, anemia iporigenerativa ed ipergammaglobulinemia policlonale.

1.1.8 Diagnosi

I pazienti con sclerodermia presentano una grande variabilità del quadro clinico. Nel 1980 sono stati sviluppati i primi criteri classificativi dall'American College of Rheumatology (ACR) nel 1980 che aiutassero i ricercatori, ma anche il clinico nel definire tale patologia in modo omogeneo. Questi includevano sclerodattilia, ulcere digitali o pitting scars e fibrosi polmonare (*tabella II*). Ma queste caratteristiche, sebbene tipiche della Sclerosi Sistemica, sono rappresentazioni di danno tissutale avanzato, per cui, si rendevano necessari nuovi criteri classificativi per diagnosticare la malattia in fase più precoce.

Criterio principale	Criteri secondari
1- Sclerodermia prossimale: Alterazioni sclerodermiche bilaterali e simmetriche in ogni localizzazione prossimale alle articolazioni MCF e MTF	1 -Sclerodattilia 2- Alterazioni delle impronte digitali: perdita del tessuto adiposo dei polpastrelli 3- Fibrosi polmonare bilaterale dimostrabile radiologicamente

Tabella II Criteri ACR (1980) per la diagnosi di Sclerodermia

Nel 2013 dalla collaborazione dell'ACR con l'EULAR (European League Against Rheumatism), è stata redatta una nuova classificazione dotata di maggiore sensibilità e specificità rispetto alla precedente e, benché questi nuovi criteri sono stati studiati per la selezione dei pazienti da inserire in studi clinici, sono strutturati anche per sovrapporsi, comunque, agli elementi utilizzati nella normale pratica clinica⁽¹⁰³⁾ (*tabella III*).

Questi nuovi criteri includono oltre all'interessamento cutaneo e polmonare di malattia, anche la presenza del fenomeno di Raynaud, teleangectasie, anomalie del pattern capillaroscopico e presenza di auto-anticorpi specifici per SSc.

Criteri ACR/EULAR 2013 per la Diagnosi della Sclerosi Sistemica		
Item	Sub-item	Score
Ispessimento cutaneo delle dita di entrambe le mani prossimale alle MCF (criterio sufficiente)	-	9
Ispessimento cutaneo delle dita (considerare il punteggio più alto)	Puffy fingers	2
	Sclerodattilia delle dita (distale alle MCF, ma prossimale alle IFP)	4
Lesioni digitali (considerare il punteggio più alto)	Ulcere ischemiche digitali	2
	Cicatrici digitali e sito di ischemia	3
Teleangectasie	-	2
Anormalità capillaroscopiche dei capillari del letto ungueale	-	2
Ipertensione arteriosa polmonare e/o malattia Interstiziale polmonare (score massimo 2)	Ipertensione arteriosa polmonare	2
	Malattia interstiziale polmonare	2
Fenomeno di Raynaud	-	3
Autoanticorpi SSc-relati (ACA, anti-ScL-70, anti-RNA polimerasi III) (score massimo 3)	Anticentromero Anti- Scl70 Anti-RNA polimerasi III	3
<p>Il punteggio totale è determinato dalla somma massimo del punteggio in ogni categoria. Pazienti con uno score totale ≥ 9 sono classificati con Sclerosi Sistemica definita.</p> <p><i>da Van den Hoogen Fetal, Ann Rheum Dis 2013(Nov);72:1747-55</i></p>		

Tabella III: Criteri ACR/EULAR (2013) per la diagnosi di Sclerodermia

Le metodiche strumentali principalmente utilizzate per valutare il coinvolgimento d'organo sono:

La TAC torace ad alta risoluzione, metodica altamente sensibile nel rilevare una interstiziopatia polmonare come nella sclerosi sistemica⁽¹⁰⁴⁾. Classicamente le lesioni sono in sede sub-pleurica, alle basi polmonari distribuite in maniera simmetrica. Si presentano con aspetto di noduli iperdensi, oppure con accentuazione della trama polmonare a tipo “vetro smerigliato” e con aree di bronchiectasie da trazione⁽¹⁰⁵⁾.

La spirometria con la misurazione della DLCO, è una metodica per l'identificazione sia della fibrosi, sia della gravità dell'interstiziopatia. Tipicamente queste pazienti hanno un quadro polmonare restrittivo che alla spirometria si evidenzia con una diminuzione della FVC (capacità vitale forzata) insieme alla TLC (capacità polmonare totale). Il rapporto invece tra FEV1/FVC, essenziale per la distinzione di una patologia ostruttiva o restrittiva, risulterà normale o leggermente aumentato con valori attorno 80%. Un altro importante parametro, indicativo di danno interstiziale è la diminuzione di DLCO inferiore al 75%⁽¹⁰⁶⁾.

Il six.minute-walking-test (6MWT) è un test semplice, ma aspecifico perché influenzato da molteplici fattori che permette di valutare la capacità funzionale residua dei pazienti. Si effettua facendo camminare il paziente, per sei minuti, ad una velocità da lui scelta, lungo un corridoio. Durante il test vengono monitorati i parametri vitali tramite un saturimetro e un cardiofrequenzimetro. Alla fine del test si calcolano i metri percorsi dal paziente e si effettua un'emogasanalisi per rivalutare i parametri dopo l'esercizio fisico.

L'Ecocardiogramma consente la misurazione di indici indiretti di ipertensione arteriosa polmonare come la pressione arteriosa polmonare

stimata (PAPs), la frazione di eiezione del ventricolo sinistro, la tricuspidal antero-posterior systolic excursion (TAPSE): e la fractional area change (FAC).

La videocapillaroscopia periungueale è una tecnica a basso costo e non invasiva, che permette l'osservazione del letto vascolare ungueale. E' ritenuta il metodo più valido per individuare le alterazioni precoci in fase di sclerodermia. Le alterazioni riscontrate all'esame sono state raggruppate da Cutolo e coll. in tre categorie:

- il pattern iniziale “**early**” caratterizzato da pochi megacapillari, alcune aree di microemorragie capillari, ma nel complesso una distribuzione capillare relativamente ben conservata e non evidente perdita di capillari;
- il pattern attivo “**active**” con frequenti megacapillari, frequenti emorragie capillari, modesta perdita di capillari e moderata disorganizzazione dell'architettura vascolare ed assente o moderata ramificazione dei capillari.
- il pattern avanzato “**late**” con ectasie irregolari dei capillari, pochi o assenti megacapillari e microemorragie, importante perdita di capillari con aree avascolari, disorganizzazione della normale architettura capillare e presenza di capillari ramificati con artborescenze ⁽¹⁰⁷⁾.

1.1.9 Terapia

Al momento attuale non esiste una terapia eziopatogenetica in grado di curare la malattia sclerodermica, ma soltanto farmaci sintomatici in grado di tenere sotto controllo i più comuni sintomi.

Le terapie a nostra disposizione per il trattamento della sclerosi sistemica si possono distinguere in terapie sintomatiche⁽¹⁰⁸⁾, mirate all'interessamento d'organo e terapie che agiscono sui meccanismi patogenetici principali.

Terapie sintomatiche organo specifiche

Gli analoghi della prostaciline vengono utilizzati nelle fasi più avanzate di malattia ed agiscono riducendo il fenomeno di Raynaud, l'insorgenza di ulcere e l'ipertensione arteriosa polmonare⁽¹⁰⁹⁾.

La terapia del fenomeno di Raynaud non è standardizzata. L'astinenza dal fumo è essenziale, l'eliminazione di alcuni farmaci, tra cui i beta-bloccanti, e la possibilità di vivere in ambiente "termostato" sono di grande aiuto. I calcio antagonisti quali la nifedipina, nella sua preparazione a lento rilascio da 30 mg (utilizzabile fino a 90mg), è attualmente il farmaco di prima scelta. L'Endoprost, una prostaciclina sintetica, si è dimostrato un potente vasodilatatore utilizzato nelle fasi più avanzate di Raynaud sclerodermico con manifestazioni ulcerose ma anche, come farmaco di elezione, nella grave ipertensione polmonare. Il Bosentan⁽¹¹⁰⁾, un antagonista dei recettori dell'endotelina 1 e 2, trova indicazione nella prevenzione di nuove ulcere acrali. La nifedipina, il verapamil, la ketanserina, il captopril hanno modesta e temporanea efficacia.

Sull'ipertensione arteriosa polmonare (PAH), più frequentemente associata alla forma cutanea limitata di SSc ed al pattern anticorpale ACA+, numerosi benefici si hanno anche con gli inibitori della 5-fosfodiesterasi, che agiscono aumentando i livelli di Ossido Nitrico e creando così vasodilatazione⁽¹¹¹⁾ e con gli antagonisti dei recettori dell'endotelina 1 e 2 (Bosentan e Macitentan), che agiscono sul rimodellamento vascolare andando ad inibire la vasocostrizione.

Per quanto riguarda le patologie gastro-intestinali, vengono raccomandati agenti antisecretori e procinetici per il trattamento del reflusso gastroesofageo. Gli inibitori di pompa protonica sono il cardine della terapia: il regime più usato è quello con somministrazione giornaliera o due volte al giorno. Le molecole procinetiche più utilizzate sono: metoclopramide, domperidone, tegaserod, cisapride.

Per quanto riguarda il coinvolgimento renale, la terapia con steroidi, immunosoppressori e plasmaferesi, non si sono dimostrati efficaci, mentre gli ACE-inibitori hanno ridotto notevolmente la mortalità associata a questa complicanza e sono quindi considerati i farmaci di scelta per il suo controllo⁽¹¹²⁾. L'uso degli ACE-inibitori nella terapia della crisi renale sclerodermica ha radicalmente cambiato la prognosi, generalmente infausta, di questa manifestazione. Il trattamento deve essere molto precoce, appena instaurata la diagnosi. Gli ACE-inibitori non devono essere sospesi anche in presenza di un'ulteriore peggioramento della funzione renale, preferendo nelle fasi iniziali quelli ad azione pronta. L'insufficienza renale può, però, progredire fino a richiedere il trattamento dialitico.

Farmaci immunosoppressori

I farmaci immunosoppressori non selettivi, utilizzati in origine nella chemioterapia antineoplastica o per prevenire il rigetto degli organi trapiantati, sono stati usati per decenni per trattare malattie autoimmuni, come il lupus eritematoso sistemico e l'artrite reumatoide.

L'immunosoppressione generica è solitamente utilizzata nella sclerodermia per trattare le singole manifestazioni d'organo come la fibrosi cutanea progressiva, la patologia interstiziale polmonare, ed il coinvolgimento cutaneo e muscolare.

I **corticosteroidi ad alto dosaggio** hanno scarsa efficacia nella SSc ed il loro uso è razionalmente limitato a quelle forme in cui è palese una forte componente flogistica (alveolite attiva, miositi, miocarditi, pericarditi, artriti). La spiegazione della scarsa efficacia dei corticosteroidi, ma anche di altri immunosoppressori, come terapia di fondo della SSc può essere ricercata proprio nella attuale concezione patogenetica della malattia: la iniziale attivazione immunologica e la conseguente produzione di citochine e fattori di crescita creano un circuito autocrino che si perpetua anche in assenza dello stimolo immune.

La *Ciclosporina* trova una minore applicazione a causa della sua nefrotossicità.

Immunosoppressori come la *Ciclofosfamide*, meglio in associazione con gli steroidi, resta al momento il trattamento approvato per l'alveolite attiva polmonare, sebbene vi siano dati contrastanti sull'efficacia del farmaco stesso. La Ciclofosfamide è un farmaco antineoplastico con azione citostatica utilizzato nella terapia di numerose neoplasie tra cui leucemie e linfomi. Fa parte della categoria degli agenti alchilanti antineoplastici, cioè farmaci che legano il DNA e lo danneggiano, bloccando la cellula in fase G2 ed impedendole di replicarsi. Nel 2006 è stato pubblicato lo studio Scleroderma Lung Study I⁽¹¹³⁾, che per primo ha messo a confronto in maniera randomizzata e controllata "Ciclofosfamide contro placebo". In questo studio la Ciclofosfamide è stata utilizzata per os ad alto dosaggio per un anno, in pazienti con "interstitial lung disease" (ILD) sintomatica, che sono stati successivamente monitorati per dodici mesi. Al termine dei 24 mesi dall'inizio del trial si sono potuti osservare miglioramenti nella fibrosi cutanea, nella dispnea e nella funzionalità polmonare statisticamente significativi.

La scarsa tollerabilità dovuta agli effetti collaterali (nausea, vomito, ematuria e, nei casi più gravi, cistite emorragica) ha spinto l'attenzione verso la ricerca di altre terapie.

Lo Scleroderma Lung Study II, uno studio della durata di due anni, ha messo a confronto una coorte di pazienti in terapia con ciclofosfamide con una coorte di pazienti in terapia con micofenolato mofetile per valutare eventuali vantaggi del micofenolato, che in vari studi aveva già dimostrato efficacia nel miglioramento cutaneo e polmonare ⁽¹¹⁴⁻¹¹⁷⁾.

Farmaci antifibrotici

Un farmaco antifibrotico ideale dovrebbe essere in grado di rimuovere l'eccesso di fibre collagene insolubile senza danneggiare la struttura dell'organo. Questo farmaco al momento non esiste.

Gli interferoni sarebbero le sostanze con la maggiore efficacia nella inibizione della sintesi di collagene e della proliferazioni fibroblastica. L'interferone gamma, il più attivo dei tre, si autoesclude per la sua azione sull'endotelio e per la sua nefrotossicità. L'interferon alfa, ancora in fase di studio, inibisce in vitro la sintesi di collagene da parte dei fibroblasti a livello trascrizionale ed agisce anche con lesione diretta sulle popolazioni fibroblastiche ad alta produzione di collagene. Purtroppo, la lunga durata della malattia in rapporto ai numerosi effetti collaterali, in attesa dei risultati degli studi in corso, ne rende difficile l'uso nella pratica clinica. Importanti passi avanti sono stati fatti nella cosiddetta "**target therapy**", una terapia che si rivolge a dei bersagli molecolari e che ha mostrato grandi vantaggi contro il meccanismo fibrotico ⁽¹¹⁸⁾. In questo senso sono stati sviluppati anticorpi contro il TNF e il TGF- β e soprattutto l'inibitore della tirosin-chinasi (imatinib), che ha dimostrato migliorare soprattutto il quadro polmonare dei pazienti ⁽¹¹⁹⁾.

Rituximab

Il Rituximab è un anticorpo anti CD20 rivolto verso i linfociti B, si è identificato come utile terapia per la riduzione della fibrosi cutanea e polmonare mediante diminuita deposizione di collagene e deplezione di miofibroblasti e linfociti B ⁽¹²⁰⁾. Il ruolo fondamentale delle cellule B nella sclerodermia (attivazione diretta dei fibroblasti, produzione citochine profibrotiche come IL6 e TGF- β , e produzione autoanticorpi stimolanti fibroblasti) ⁽¹²¹⁾. ha reso questo farmaco uno dei possibili trattamenti farmacologici, tuttora considerati off-label, per questa patologia. Da una analisi del gruppo EUSTAR nel 2014 su 63 pazienti con sclerodermia è stato evidenziato come il Rituximab induca una

riduzione della fibrosi cutanea e un rallentamento di quella polmonare. Inoltre la terapia con 2 cicli da 1 grammo di Rituximab a distanza di 6 mesi ha dimostrato una buona tolleranza, miglioramento del quadro cutaneo (sia valutato con il modified Rodnan Skin Score che su biopsia) e stabilizzazione di quello polmonare⁽¹²²⁾.

Micofenolato Mofetile

Il Micofenolato Mofetile è un potente inibitore dell'enzima inosina 5' monofosfato deidrogenasi (IMPDH), fondamentale per la sintesi dei nucleotidi purinici, andando ad inibire preferenzialmente l'isoforma II dell'enzima espresso selettivamente dai linfociti B e T attivati, bloccandone la proliferazione e la risposta anticorpale. Poiché la proliferazione dei linfociti B e T è strettamente legata alla sintesi delle purine (mentre altri tipi di cellule possono recuperare le purine da altre fonti), ciò si traduce in un blocco della produzione di linfociti. In particolare, l'MPA inibisce la risposta proliferativa dei linfociti a vari tipi di stimoli; inoltre blocca la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B e l'adesione dei linfociti all'endotelio vascolare, un evento importante ai fini della risposta immunitaria. Riduce anche la produzione di citochine derivanti dai linfociti e macrofagi ed i fattori di crescita come PDGF, TNF, TGF1; esercita anche un'azione antinfiammatoria diminuendo la produzione di NO⁽¹²³⁾.

Oltre alla sua efficacia nel rigetto dei trapianti⁽¹²⁴⁾, questo farmaco si è dimostrato molto utile in diverse malattie autoimmuni come nella nefrite lupica^(125,126), nelle malattie infiammatorie intestinali⁽¹²⁷⁾, nelle epatiti autoimmuni. Nella sclerosi sistemica in particolare, la terapia a lungo termine con MMF si è associata con una diminuzione dello score di Rodnan, un miglioramento delle biopsie cutanee e una stabilità del quadro polmonare⁽¹²⁸⁾. Nei pazienti resistenti al metotrexate, il micofenolato si è dimostrato essere una valida alternativa nell'arrestare la progressione di malattia.

Associazione Rituximab e Micofenolato Mofetile

Il nostro gruppo di ricerca clinica ha dimostrato, un uno studio preliminare , con i limiti di uno studio monocentrico e di una piccola casistica di pazienti, che l'associazione di Rituximab e Micofenolato per la terapia della Sclerosi sistemica è ben tollerato, sicuro e potenzialmente efficace per il coinvolgimento cutaneo e polmonare di malattia ⁽¹²⁹⁾.

Nintedanib

Il Nintedanib è un inibitore intracellulare della Tirosin Kinasi i cui bersagli sono il PDGF receptor α e β , il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) receptor 1-3 e fattore di crescita vascolare (VEGF) receptor 1-3 ⁽¹³⁰⁾. E' stato approvato per il trattamento dei pazienti con fibrosi polmonare idiopatica. Dimostrando che il trattamento con 150mg di Nintedanib in doppia somministrazione riduce il declino della funzione polmonare e la progressione di malattia nei pazienti con fibrosi polmonare idiopatica ⁽¹³¹⁾.

Anche nei pazienti con interstiziopatia polmonare associata alla sclerosi sistemica trattati con Nintedanib si è osservato una riduzione del declino della funzionalità polmonare rispetto al placebo, non sono state osservati altri benefici nelle altre manifestazioni della SSc come il coinvolgimento cutaneo. Gli effetti collaterali sono stati simili ai pazienti con fibrosi polmonare idiopatica come gli eventi gastrointestinali tra cui la diarrea ^(132 - 136).

Scopo dello studio

L'obiettivo principale del nostro progetto è stato quello di chiarire la prevalenza, la specificità, l'importanza prognostica ed il ruolo patogenetico degli autoanticorpi anti-PDGFR nella Sclerosi Sistemica. L'attenzione si è rivolta in particolare a definire le regioni del recettore coinvolte nell'innescare dei circuiti di segnale intracellulari in conseguenza del legame ad esse di fattori fisiologicamente presenti (la citochina PDGF) o di fattori patogeni come gli autoanticorpi anti-recettore del PDGF.

Attraverso il clonaggio di autoanticorpi da cellule B memoria di pazienti sclerodermici, sono state identificate sottoclassi di anticorpi anti-PDGFR umano dotate di attività biologica e quindi correlate con lo sviluppo della malattia.

Grazie al servizio fornito dalla Pepscan Presto, Lelystad, Olanda, è stata costruita una specifica library peptidica con lo scopo di valutare clinicamente il legame tra gli epitopi conformazionali del PDGFR e gli autoanticorpi presenti nel siero di pazienti sclerodermici e di identificare quali tra questi epitopi fossero il bersaglio di una maggiore reattività dei sieri. Tutto ciò ha reso possibile la costruzione di una mappa funzionale della regione extracellulare del PDGFR α umano.

Scopo del lavoro è stato quello di analizzare la reattività di 25 sieri di pazienti affetti da Sclerosi Sistemica nei confronti di 140 diversi peptidi contenuti in una specifica library peptidica conformazionale generata dalla Pepscan Presto, Lelystad, Olanda.

I primi 60 peptidi rappresentano la proteina NOX-2, appartenente alla famiglia delle NADPHossidasi, responsabile della produzione dei radicali liberi dell'ossigeno e importante nella patogenesi della Sclerosi Sistemica. I successivi 60 peptidi rappresentano i primi tre domini della porzione extracellulare del PDGFR α umano iperespresso sia nella cute che nei

fibroblasti di pazienti sclerodermici. Gli ultimi 20, invece, sono stati inseriti come peptidi controllo.

Questa library peptidica ha lo scopo di valutare clinicamente il legame tra gli epitopi conformazionali del PDGFR e gli autoanticorpi presenti nel siero di pazienti sclerodermici e di identificare quali tra questi epitopi possano essere il bersaglio di una maggiore reattività dei sieri.

Secondo la nostra ipotesi, infatti, sia la proteina NOX-2 che il PDGFR rappresenterebbero il bersaglio di una risposta autoimmunitaria da parte dei pazienti affetti da Sclerosi Sistemica.

La reattività a ciascun peptide è stata testata mediante uno specifico saggio PEPSCAN-based ELISA, lo stesso è stato fatto per 25 sieri controllo. Questi risultati, poi, sono stati utilizzati per confrontare i 25 sieri di pazienti con i 25 controlli al fine di:

- 1) identificare un set di peptidi che riuscissero a discriminare i due gruppi in maniera statisticamente significativa;
- 2) identificare i sieri dei pazienti più reattivi e indicare contro quali peptidi reagissero più spiccatamente;
- 3) mettere in luce la possibile presenza di differenze tra la reattività dei sieri di pazienti con Sclerosi cutanea diffusa e quella dei pazienti con Sclerosi cutanea limitata e confrontare ciascun gruppo con il gruppo controllo;
- 4) costruire dei sottogruppi all'interno del gruppo dei pazienti sclerodermici sulla base della differente risposta ai peptidi, al fine di poter individuare elementi utili nella fisiopatogenesi o nella prognosi della malattia;
- 5) definire un valore cut off per i peptidi più significativi allo scopo di sviluppare in futuro un possibile test diagnostico epitope-based.

Materiali e metodi

Sono stati raccolti, previa approvazione del Comitato Etico Locale e firma del consenso informato, i campioni di sangue periferico di 25 pazienti affetti da SSc (13 dei quali affetti dalla forma cutanea limitata e 12 dalla variante diffusa) e 25 campioni di sangue periferico di controlli sani. Il siero è stato aliquotato e conservato a -20°C.

3.1 Test ELISA

I sieri sono stati sottoposti ad un saggio ELISA⁽¹³⁷⁾. La proteina ricombinante del PDGFR umano è stata immobilizzata su una piastra da 96 pozzetti, sono state aggiunte le aliquote di siero diluite 1:100 ed incubate overnight. Dopo lavaggi ed incubazione con un anticorpo anti-IgG umane coniugato con perossidasi la reazione è stata sviluppata e l'assorbanza misurata a 450 nm in uno spettrofotometro a piastra.

I sieri che hanno presentato il legame con il PDGFR sono stati testati attraverso un test ELISA competitivo, utilizzando tre diversi peptidi, corrispondenti agli epitopi conformazionali riconosciuti dall'anticorpo monoclonale anti-PDGFR. I risultati sono stati analizzati con analisi della varianza a una via per dati non parametrici, con un test di Kruskal-Wallis e Dunn's per confronti multipli (analisi del legame peptidico, ELISA diretto e competitivo) o t-test non appaiato a 2 code (con una confidenza di intervallo del 95% [95% CIs]).

I sieri così ottenuti sono stati spediti a Pepscan Presto, Lelystad, Olanda e testati con una Pepscan-based ELISA.

3.2 Costruzione di una library peptidica conformazionale per il PDFR

I sieri così ottenuti sono stati spediti a Pepscan Presto, Lelystad, Olanda e testati con una Pepscan-based ELISA.

Grazie al servizio fornito dalla Pepscan Presto, Lelystad, Olanda è stata generata una library peptidica conformazionale comprendente i primi tre domini immunoglobulinici della porzione extracellulare del PDGFR α umano. Sono stati sintetizzati 80 diversi peptidi, della lunghezza di 15 amminoacidi ciascuno, parzialmente sovrapposti tra loro e fiancheggiati da residui di glicina o di cisteina. I peptidi della library sono stati immobilizzati su una piastra da 96 pozzetti e poi incubati con il siero diluito 1:1000 overnight a 4°. Dopo lavaggi ed incubazione con un anticorpo coniugato con perossidasi, la reazione colorimetrica è stata quantificata da un sistema di image processing ed i risultati analizzati utilizzando il Wilcoxon rank test.

I primi sono stati mantenuti in conformazione lineare, mentre i secondi sono stati sintetizzati su scaffold chimici trivalenti in grado di conferire loro una conformazione looped⁽¹³⁷⁾. Ciascuno scaffold chimico contiene infatti tre gruppi 1,3,5-tribromomesitylene (T3) in grado di reagire in rapporto 1:1 con i residui di cisteina presenti alle estremità dei peptidi, dando luogo alle seguenti strutture macromolecolari bicicliche:

Cys – oligomero di 15 aminoacidi – Cys – oligomero di 15 aminoacidi – Cys.

Quindi ciascun peptide presenta la sequenza target in posizione 2-16 e 18-32 e i residui di cisteina in posizione 1, 17, 33.

Mediante tale tecnologia (Chemically LInked Peptides on Scaffolds, CLIPS64, Pepscan Therapeutics BV, Olanda), gli 80 peptidi lineari sono stati uniti tra loro in maniera tale da ottenere tutte le possibili combinazioni di peptidi biciclici T3-CLIPS da 33 aminoacidi ciascuno (*figura 9*), per un

totale di 6400 peptidi, così da rappresentare il numero massimo possibile di epitopi conformazionali del recettore ⁽¹³⁷⁾. Il legame della citochina PDGF-BB e delle IgG monoclonali umane ricombinanti a ciascun peptide è stato quindi testato mediante uno specifico saggio PEPSCAN-based ELISA ^(50,51).

Sulla base di questi risultati, sono stati poi selezionati 60 peptidi rappresentanti i primi tre domini extracellulari del PDGFR umano, a cui sono stati aggiunti 20 peptidi controllo e 60 rappresentanti la proteina NOX-2 e 60 rappresentanti la proteina NOX-2.

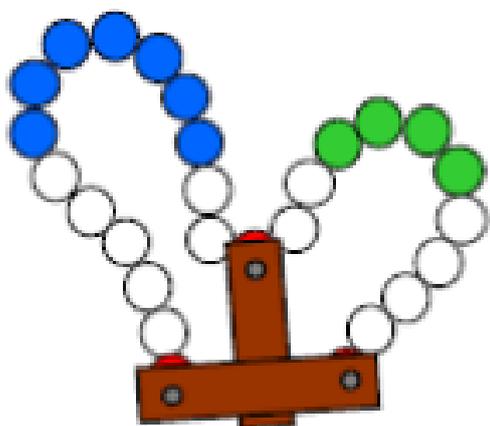


Figura 9: Ricostruzione degli epitopi conformazionali del II e III dominio del PDGFRa umano su scaffold chimici T3-CLIPS.

3.2 Costruzione del database

Il set dei 140 peptidi contenuti nella library è stato utilizzato per testare 50 sieri: 25 sieri di pazienti SSc afferenti al reparto di Clinica Medica di Ancona e 25 sieri controllo di individui afferenti al Centro Trasfusionale. Nella creazione del database, le reattività dei sieri sono state considerate come osservazioni (riportate nelle righe), mentre i peptidi da 1 a 140 sono stati considerati come variabili (riportati nelle colonne). I sieri dei pazienti sclerodermici sono stati indicati con SSc seguiti dal numero identificativo.

Mentre i sieri controllo sono indicati con la sigla D0 seguita dal numero identificativo. Tutti contenuti nella colonna SIERO:

I 140 peptidi, considerati come variabili di studio, vengono indicati con la sigla PEP seguita dal numero identificativo e riportati nelle colonne. Nella prima colonna del database, infine, è stato inserito il GRUPPO. Dei 25 pazienti inclusi nello studio, infatti, 13 di essi sono affetti da Sclerosi cutanea limitata (lsSSc) indicati come GRUPPO 1 (G1), mentre i restanti 12 presentano la forma diffusa dsSSc, indicati come GRUPPO 2 (G2).

I due gruppi sono costituiti rispettivamente dai seguenti pazienti:

- **G1:** SSc033; SSc042; SSc067; SSc048; SSc008; SSc080; SSc083; SSc069; SSc001; SSc066; SSc052; SSc081; SSc058.
- **G2:** SSc005; SSc002; SSc006; SSc014; SSc003; SSc084; SSc085; SSc086; SSc087; SSc088; SSc089; SSc090.

Questo ci ha permesso di condurre analisi separate per variante di malattia. Le lettere (GRUPPO A, B), infine, indicano l'ulteriore divisione fatta sulla base dei risultati dello studio, che sarà meglio definita in seguito nella sezione "Cluster Analysis".

Nella *figura 10* viene mostrato il database alla fine della compilazione.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1	GRUPPO	SIERO	PEP1	PEP2	PEP3	PEP4	PEP5	PEP6	PEP7	PEP8	PEP9	PEP10	PEP11	PEP12	PEP13	PEP14	PEP15	PEP16
2	GRUPPO 2A	SSC002	814	820	830	798	707	873	950	924	946	1086	926	828	856	1037	862	
3	GRUPPO 2A	SSC086	778	723	803	771	637	767	863	806	868	1083	820	700	750	868	721	
4	GRUPPO 2A	SSC087	739	599	729	755	617	636	792	1520	1243	960	751	683	847	840	688	
5	GRUPPO 2A	SSC089	1008	958	922	893	789	1054	1178	939	946	1060	927	862	950	1002	831	
6	GRUPPO 1A	SSC001	476	508	494	511	449	628	617	510	559	578	494	472	472	563	516	
7	GRUPPO 1A	SSC033	512	461	443	421	357	443	513	487	462	484	524	493	529	528	475	
8	GRUPPO 1A	SSC042	566	507	501	498	414	514	611	573	557	575	622	596	619	671	591	
9	GRUPPO 1A	SSC058	681	488	517	616	508	703	713	587	520	695	687	637	691	638	501	
10	GRUPPO 1A	SSC067	462	504	447	487	430	547	633	510	555	588	516	481	488	596	491	
11	GRUPPO 1A	SSC081	787	674	723	681	544	618	751	731	700	843	711	652	641	852	766	
12	GRUPPO 1B	SSC008	140	143	135	147	127	163	163	153	153	154	154	145	143	152	142	
13	GRUPPO 1B	SSC048	241	260	246	249	214	277	315	291	313	306	265	251	257	336	275	
14	GRUPPO 1B	SSC052	147	156	145	162	150	178	171	175	176	169	161	161	147	169	158	
15	GRUPPO 1B	SSC066	284	275	275	284	279	330	364	324	332	340	293	267	242	324	302	
16	GRUPPO 1B	SSC069	326	309	284	251	216	310	366	319	313	352	304	287	310	348	276	
17	GRUPPO 1B	SSC080	226	209	203	197	176	204	248	242	231	231	232	211	237	251	209	
18	GRUPPO 1B	SSC083	296	301	307	305	286	304	361	415	416	319	302	287	292	345	323	
19	GRUPPO 2B	SSC003	473	446	413	379	352	477	471	464	456	493	438	403	433	435	341	
20	GRUPPO 2B	SSC005	307	332	309	326	289	328	357	337	330	373	320	328	326	365	312	
21	GRUPPO 2B	SSC006	318	306	298	279	274	369	399	367	365	417	317	323	317	347	294	
22	GRUPPO 2B	SSC014	393	386	394	380	284	364	438	417	406	434	438	396	427	475	389	
23	GRUPPO 2B	SSC084	209	189	177	180	170	207	224	189	174	212	195	202	198	201	187	
24	GRUPPO 2B	SSC085	347	333	313	317	277	368	443	386	414	435	350	300	328	371	300	
25	GRUPPO 2B	SSC088	155	156	184	174	146	165	190	184	183	198	166	156	150	196	176	
26	GRUPPO 2B	SSC090	449	476	460	475	381	569	674	517	542	548	437	424	408	504	452	

Figura 10: Il database di studio.

3.4 Analisi Statistica

3.4.1 Il software SAS® (SAS® Institute Inc., Cary, NC, USA)

L'analisi dei dati è stata condotta utilizzando il software SAS® (acronimo per Statistical Analysis System) che è probabilmente il software più utilizzato per condurre analisi statistiche che vanno da semplici tecniche descrittive e inferenziali alle più complesse analisi multivariate.

3.4.2 Il test di Wilcoxon-Mann-Whitney

Il test di Wilcoxon-Mann-Whitney (abbreviato in U test) o test della somma dei ranghi, in alcuni testi chiamato semplicemente test di Wilcoxon per 2 campioni indipendenti, è un test non parametrico che consente di verificare se due campioni indipendenti provengono dalla stessa popolazione. E' l'analogo non parametrico del test t di Student per due campioni indipendenti.

3.4.3 Cluster Analysis

Lo scopo dell'analisi dei gruppi, o cluster analysis, è quello di classificare gli individui di una collettività, raggruppando insieme tutti quelli che presentano caratteristiche simili e formando in questo modo sottogruppi omogenei al loro interno. Dal punto di vista metodico, si tratta di una classificazione numerica, nel senso che la "similarità" fra le caratteristiche di due individui viene misurata attraverso opportuni indici numerici, per cui i sottogruppi sono costituiti da individui che presentano valori degli indici di similarità vicini tra di loro e che contemporaneamente risultino distanti da quelli rilevati sugli individui di un altro gruppo qualsiasi.

Nella nostra analisi sono stati applicati metodi diversi, in modo da poter verificare se si potessero ottenere gli stessi risultati e, quindi, avvalorare gli stessi. Per comodità, nella sezione RISULTATI, si riporta solamente il metodo centroide. I gruppi ottenuti sono stati poi rappresentati mediante un grafico chiamato **dendrogramma**, in cui su uno degli assi sono riportati i

sieri del nostro studio e sull'altro le distanze tra gli individui e fra i gruppi. Questa rappresentazione consente di individuare gli elementi che appartengono ad uno stesso gruppo ad ogni livello di processo di aggregazione.

3.4.4 Analisi delle componenti principali

Per poter ottenere uno *scatter plot* che mostrasse visivamente questa divisione per gruppi, considerando i due grandi gruppi di peptidi (PEP1-PEP60 rappresentante NOX, PEP61-120 rappresentante il PDGFr), è necessario avere una variabile di sintesi che raggruppi tutte le altre e ne sia espressione. Questo è possibile attraverso la trasformazione in componenti principali. Mediante questo tipo di analisi, da un insieme di $n1$ variabili è possibile ottenere un nuovo gruppo di $n2$ variabili incorrelate tra di loro e che forniscono le stesse informazioni delle variabili originarie, dette componenti principali.

3.4.5 La curva ROC e la determinazione di un valore cut off

La curva ROC (Receiver Operating Characteristics) è quella curva che, in un diagramma cartesiano, indica, per ciascun punteggio cut off, come variano sensibilità (rappresentata sull'asse Y) e 1-specificità (riportata sull'asse X). Entrambi gli assi, in quanto rappresentano dei valori di probabilità, hanno come valore minimo 0 e valore massimo 1. L'origine degli assi corrisponde al caso del test con perfetta specificità (1,00, da cui $1 - \text{Specificità} = 0$) ma sensibilità nulla. In pratica, è il test che considera tutti i casi come negativi. Al vertice opposto del quadrato troviamo invece il punto che corrisponde al test con perfetta sensibilità ma specificità nulla, ossia il test che considera tutti i casi come positivi. La diagonale che unisce questi due punti è detta linea del caso, che corrisponde alla retta sulla quale si trovano i punti di quei test che discriminano in modo causale. Calcolando poi l'area sotto la curva sarà possibile ottenere quel valore a cui corrisponde la sensibilità e la specificità più elevate.

Un valore *cut off* viene definito come quel punteggio che ha una buona capacità di discriminazione in un test, tale che se il test risulti essere inferiore a questo valore, allora sarà considerato test negativo, altrimenti sarà test positivo. La determinazione di un punteggio *cut off* è possibile per qualunque tipo di test: basta avere a disposizione dati su almeno due gruppi di soggetti. Il punto, però, è che, affinché il test abbia una buona capacità di discriminazione, occorre che la differenza fra i punteggi ai test dei due gruppi sia la più ampia possibile.

Risultati

4.1 Confronto tra i due gruppi principali: SSc vs Controlli

Il primo obiettivo del nostro studio è stato quello di testare la presenza di una diversa reattività dei sieri di pazienti sclerodermici rispetto ai sieri controllo e quindi di identificare quali peptidi della library riuscissero meglio a discriminare i due gruppi.

Abbiamo quindi applicato il test di Mann-Whitney-Wilcoxon per ciascun peptide, da PEP1 a PEP140, considerando un livello di significatività α pari a 0,05.

I peptidi per i quali abbiamo riscontrato una reattività statisticamente differente tra i due gruppi sono i seguenti:

VARIABILE	SEQUENZA PEPTIDICA	WILCOXON TEST (p value unilaterale)
PEP1	CNFARKRIKNPEGGLYCFNVEWSVNARVNNSDC	0,0702
PEP2	CQNESYLNFAKRIKNCVNARVNNSDPYSVALC	0,0797
PEP3	CSELGDRQNESYLNFAACNSDPYSVALSELGDR	0,0919
PEP4	CVRGQTAESLAVHNITCNSDPYSVALSELGDR	0,0701
PEP5	CESLAVHNITVSEQKICSELGDRQNESYLNFA	0,0639
PEP6	CQTAESLAVHNITVSECQNESYLNFAKRIKNC	0,1241
PEP7	CVSEQKISEWKGKIKESCQNESYLNFAKRIKNC	0,0603
PEP8	CAVHNITVSEQKISEWCSYLNFAKRIKNPEGC	0.0299
PEP9	CQKISEWKGKIKESPIPCNFARKRIKNPEGGLYC	0.0250
PEP10	CGDRQNESYLNFAKRCRCHGAERIVRGQTAESLC	0.0457
PEP11	CVNARVNNSDPYSVALCFNVEWSVNARVNNSDC	0,0526
PEP12	CVALSELGDRQNESYLCFNVEWSVNARVNNSDC	0,0516
PEP13	CSYLNFAKRIKNPEGCFNVEWSVNARVNNSDC	0,0569
PEP14	CFNVEWSVNARVNNSDCRVNNSDPYSVALSEL	0.0395
PEP15	CNSDPYSVALSELGDRVNSDPYSVALSEL	0,0591
PEP16	CGDRQNESYLNFAKRCRVNNSDPYSVALSEL	0,0689
PEP17	CSYLNFAKRIKNPEGCRVNNSDPYSVALSEL	0,0887
PEP18	CVRGQTAESLAVHNITCRVNNSDPYSVALSEL	0,0951
PEP19	CVSEQKISEWKGKIKESCRVNNSDPYSVALSEL	0,0651
PEP20	CQKISEWKGKIKESPIPCRVNNSDPYSVALSEL	0,0755
PEP21	CFNVEWSVNARVNNSDCPYSVALSELGDRQNEC	0,1108
PEP22	CRVNNSDPYSVALSELCPYSVALSELGDRQNEC	0,0798
PEP23	CSYLNFAKRIKNPEGCPYSVALSELGDRQNEC	0,0639
PEP24	CHGAERIVRGQTAESLCPYSVALSELGDRQNEC	0,0558

PEP25	CERIVRGQTAESLAVHCPYSVALSELGDRQNEC	0,0651
PEP26	CQKISEWGGKIKESPIPCPYSVALSELGDRQNEC	0.0439
PEP27	CFNVEWSVNARVNNSDCVASELGDRQNESYLC	0,0857
PEP28	CQNESYLNFAKRIKNCVASELGDRQNESYLC	0,0741
PEP29	CSYLNFAKRIKNPEGCVASELGDRQNESYLC	0.0387
PEP30	CEWSVNARVNNSDPYSCSELGDRQNESYLNFAC	0.0430
PEP31	CVRGQTAESLAVHNITCSELGDRQNESYLNFAC	0,0728
PEP32	CVSEQKISEWGGKIKESSELGDRQNESYLNFAC	0,0783
PEP33	CVRGQTAESLAVHNITCQTAESLAVHNITVSEC	0,0741
PEP34	CQTAESLAVHNITVSECQTAESLAVHNITVSEC	0,1036
PEP35	CSELGDRQNESYLNFAFCFNVEWSVNARVNNSDC	0,109
PEP36	CGDRQNESYLNFAKRCCEWSVNARVNNSDPYSC	0,0755
PEP37	CGDRQNESYLNFAKRCVNARVNNSDPYSVALC	0,0968
PEP38	CEWSVNARVNNSDPYSCRVNNSDPYSVALSEL	0,0887
PEP39	CVSEQKISEWGGKIKESCRVNNSDPYSVALSEL	0,1036
PEP40	CSYLNFAKRIKNPEGCPYSVALSELGDRQNEC	0,0639
PEP41	CNFAKRIKNPEGGLYCPYSVALSELGDRQNEC	0.0495
PEP42	CHGAERIVRGQTAESLCPYSVALSELGDRQNEC	0,0536
PEP43	CFNVEWSVNARVNNSDCVASELGDRQNESYLC	0,0639
PEP44	CVASELGDRQNESYLCVASELGDRQNESYLC	0.0439
PEP45	CSELGDRQNESYLNFAFCVASELGDRQNESYLC	0.0466
PEP46	CGDRQNESYLNFAKRCVASELGDRQNESYLC	0.0421
PEP47	CNFAKRIKNPEGGLYCVASELGDRQNESYLC	0,0536
PEP48	CVSEQKISEWGGKIKESCVASELGDRQNESYLC	0,0603
PEP49	CVNARVNNSDPYSVALCSELGDRQNESYLNFAFC	0,0769
PEP50	CPYSVALSELGDRQNECSELGDRQNESYLNFAFC	0,058
PEP51	CSELGDRQNESYLNFAFCSELGDRQNESYLNFAFC	0,0558
PEP52	CGDRQNESYLNFAKRCSELGDRQNESYLNFAFC	0,0715
PEP53	CQNESYLNFAKRIKNCSELGDRQNESYLNFAFC	0,0516
PEP54	CSYLNFAKRIKNPEGCSELGDRQNESYLNFAFC	0,0526
PEP55	CQKISEWGGKIKESPIPCSELGDRQNESYLNFAFC	0,0935
PEP56	CEWSVNARVNNSDPYSCGDRQNESYLNFAKRC	0,0639
PEP57	CVNARVNNSDPYSVALCGDRQNESYLNFAKRC	0,0755
PEP58	CRVNNSDPYSVALSELGDRQNESYLNFAKRC	0,0812
PEP59	CVASELGDRQNESYLCGDRQNESYLNFAKRC	0.0379
PEP60	CVSEQKISEWGGKIKESCGDRQNESYLNFAKRC	0.0476
PEP61	CSEGVVPASYDSRQGFCEKVVQLNSSFSLRAF	0.0156
PEP62	CEENELEGRHIYVPCVVQLNSSFSLRAFGE	0.0326
PEP63	CIPARTTDPETPVTLHCNHTQTEENELEGRHIC	0.0457
PEP64	CSEGVVPASYDSRQGFCHTQTEENELEGRHIYC	0.0306
PEP65	CTEENELEGRHIYVCTQTEENELEGRHIYC	0,0526
PEP66	CSAIIPARTTDPETPVCTQTEENELEGRHIYC	0.0363
PEP67	CAIIPARTTDPETPVCTQTEENELEGRHIYIC	0.0476
PEP68	CEKVVQLNSSFSLRAFCEENELEGRHIYVPC	0,0505
PEP69	CENELEGRHIYVPCDCEENELEGRHIYVPC	0,0812
PEP70	CAIIPARTTDPETPVTCEENELEGRHIYVPC	0,1429

PEP71	CAAARQATREVKEMKKCNNEVVDLQWTPGEVC	0,0769
PEP72	CEAAARQATREVKEMKCSGDYEAARQATREVC	0.0421
PEP73	CAAARQATREVKEMKKCSGDYEAARQATREVC	0.0292
PEP74	CARQATREVKEMKKVTCSGDYEAARQATREVC	0.0319
PEP75	CVVTAAVFNNEVVDLQCGDYEAARQATREVKC	0.0239
PEP76	CDYEAARQATREVKECGDYEAARQATREVKC	0.0421
PEP77	CRQATREVKEMKKVTICGDYEAARQATREVKC	0.0312
PEP79	CAAVFNNEVVDLQWTYCYEAARQATREVKEMC	0.0274
PEP80	CGDYEAARQATREVKCYEAARQATREVKEMC	0.0239
PEP81	CVKEMKKVTISVHEKGCYEAARQATREVKEMC	0.0387
PEP82	CYLIVEDDDSAIIPACEAARQATREVKEMKC	0,0516
PEP83	CVFNNEVVDLQWTPGCEAARQATREVKEMKC	0.0319
PEP84	CNNEVVDLQWTPGEVCAARQATREVKEMKKVC	0,1861
PEP85	CAVFNNEVVDLQWTPCATREVKEMKKVTISVC	0,0755
PEP86	CVFNNEVVDLQWTPGCATREVKEMKKVTISVC	0,1054
PEP87	CFNNEVVDLQWTPGECATREVKEMKKVTISVC	0,1261
PEP88	CVTAAVFNNEVVDLQWCLVIVEDDDSAIIPARC	0,109
PEP89	CAAVFNNEVVDLQWTYCLVIVEDDDSAIIPARC	0,0769
PEP90	CIVVTAAVFNNEVVDLCDSRQGFNGTFTVGPYC	0,058
PEP91	CATREVKEMKKVTISVCQGFNGTFTVGPYIAEC	0,0526
PEP92	CVTAAVFNNEVVDLQWCNGTFTVGPYIAEATVC	0,0689
PEP93	CEAAARQATREVKEMKCNFTVGPYIAEATVC	0,0715
PEP94	CATREVKEMKKVTISVCNGTFTVGPYIAEATVC	0,0626
PEP95	CYLIVEDDDSAIIPACIVVTAAVFNNEVVDLC	0,0688
PEP96	CSYDSRQGFNGTFTVGCIVVTAAVFNNEVVDLC	0,0536
PEP97	CVIVEDDDSAIIPARTCVTAAVFNNEVVDLQWC	0.0495
PEP98	CVIVEDDDSAIIPARTCAAVFNNEVVDLQWTYC	0,0797
PEP99	CTAAVFNNEVVDLQWTCAAVFNNEVVDLQWTYC	0.0421
PEP100	CVFNNEVVDLQWTPGCAAVFNNEVVDLQWTYC	0.0313
PEP101	CTREVKEMKKVTISVHCAAVFNNEVVDLQWTYC	0,0515
PEP102	CEVKEMKKVTISVHEKCAAVFNNEVVDLQWTYC	0,0856
PEP103	CDYLVIVEDDDSAIIPCAVFNNEVVDLQWTPC	0,0887
PEP104	CTAAVFNNEVVDLQWTCVAVFNNEVVDLQWTPC	0,0676
PEP105	CAARQATREVKEMKKVCAVFNNEVVDLQWTPC	0,0755
PEP106	CQATREVKEMKKVTISCFNNEVVDLQWTPGEC	0,0728
PEP107	CATREVKEMKKVTISVCFNNEVVDLQWTPGEC	0,0603
PEP108	CRQATREVKEMKKVTICNENKVVQLNSSFSLC	0,1939
PEP109	CIPARTDPETPVTLHCSSASAAHTGLYTAYYC	0,0639
PEP110	CRQATREVKEMKKVTICAHTGLYTAYYNHTQTC	0,1542
PEP111	CEEESDVEIRNEENNCNHTQTEENELEGRHIC	0,0639
PEP112	CDDSAIIPARTDPETCNHTQTEENELEGRHIC	0,1343
PEP113	CIPARTDPETPVTLHCNHTQTEENELEGRHIC	0,1241
PEP114	CFNNEVVDLQWTPGECNHTQTEENELEGRHIC	0,1344
PEP115	CTVGPYIAEATVKGKCDPDVAFVPLGMTDYLC	0,1071
PEP116	CFNVYALKATSELDLECDPDVAFVPLGMTDYLC	0.0495
PEP117	CVTAAVFNNEVVDLQWCDPDVAFVPLGMTDYLC	0,0627
PEP118	CEIKVPSIKLVYTLTVCDPDVAFVPLGMTDYLC	0,0639

PEP119	CSEVSWQYPMSEEESSCIPARTTDPETPVTLHC	0,0755
PEP120	CFNNEVVDLQWYTPGECTDPETPVTLHNSEGVC	0,0951
PEP121	CYYAVKFRKGSPDDIECGAGPGRELIYNQKEGC	0,0639
PEP122	CYYAVKFRKGSPDDKECGAGPGRELIYNQKEGC	0,0812
PEP123	CYYAVKFRKGSPDDNECGAGPGRELIYNQKEGC	0,0591
PEP124	CYYAVKFRKGSPDDPECGAGPGRELIYNQKEGC	0,0715
PEP125	CYYAVKFRKGSPDDQECGAGPGRELIYNQKEGC	0,0741
PEP126	CYYAVKFRKGSPDDRECGAGPGRELIYNQKEGC	0,0651
PEP127	CYYAVKFRKGSPDDTECGAGPGRELIYNQKEGC	0,0591
PEP128	CYYAVKFRKGSPDDYECGAGPGRELIYNQKEGC	0,0769
PEP129	CYYAVKFRKGSPDDVACGAGPGRELIYNQKEGC	0,0676
PEP130	CYYAVKFRKGSPDDVECGAGPGRELIYNQKEGC	0,0651
PEP131	CYYAVKFRKGSPDDVFCGAGPGRELIYNQKEGC	0,0558
PEP132	CYYAVKFRKGSPDDVGCAGPGRELIYNQKEGC	0.0495
PEP133	CYYAVKFRKGSPDDVHCGAGPGRELIYNQKEGC	0,0627
PEP134	CYYAVKFRKGSPDDVICGAGPGRELIYNQKEGC	0.0476
PEP135	CYYAVKFRKGSPDDVKCGAGPGRELIYNQKEGC	0,0537
PEP136	CYYAVKFRKGSPDDVNCGAGPGRELIYNQKEGC	0.0421
PEP137	CYYAVKFRKGSPDDVPCGAGPGRELIYNQKEGC	0.0412
PEP138	CYYAVKFRKGSPDDVQCGAGPGRELIYNQKEGC	0,0651
PEP139	CYYAVKFRKGSPDDVRCGAGPGRELIYNQKEGC	0,0627
PEP140	CYYAVKFRKGSPDDVTCGAGPGRELIYNQKEGC	0,0755

Tabella B: Test di Mann-Withney-Wilcoxon per i due gruppi principali ($\alpha = 0.05$)

Dall'analisi dei risultati è emerso che:

- Esiste una differente reattività dei sieri dei pazienti SSc rispetto ai sieri controllo nei confronti di alcuni peptidi contenuti nella library. Ciò significa che i sieri dei pazienti sclerodermici contengono autoanticorpi che riconoscono epitopi conformazionali specifici: 13 di essi appartenenti a NOX2 e 21 al PDGFR.
- Tra i peptidi che sono risultati statisticamente significativi è stato possibile identificarne alcuni (PEP8-PEP9-PEP61-PEP75) che riescono a discriminare in maniera più marcata i pazienti dai controlli.

4.2 Confronto tra i sottogruppi SSc: G1 e G2 e i Controlli

Una volta messa in evidenza l'esistenza di una diversa reattività tra i sieri dei pazienti SSc e i sieri Controllo, siamo voluti andare a vedere se esisteva una differente risposta anche tra sieri dei sottogruppi di pazienti affetti da Sclerosi cutanea con una forma limitata e sieri dei pazienti affetti da Sclerosi cutanea con forma diffusa. Abbiamo quindi suddiviso il gruppo SSc in due sottogruppi, includendo in G1 i pazienti con Sclerosi cutanea limitata (lsSSc) e in G2 quelli con Sclerosi cutanea diffusa (dsSSc).

- **G1(lsSSc):** SSc033; SSc042; SSc067; SSc048; SSc008; SSc080; SSc083; SSc069; SSc001; SSc066; SSc052; SSc081; SSc058;

- **G2 (dsSSc):** SSc005; SSc002; SSc006; SSc014; SSc003; SSc084; SSc085; SSc086; SSc087; SSc088; SSc089; SSc090.

Abbiamo quindi condotto delle analisi separate per valutare se ci fossero delle differenze tra i pazienti affetti da lsSSc e quelli affetti dsSSc. L'ipotesi di base, formulata al momento della costruzione della library, infatti, prevedeva che i pazienti con sclerosi diffusa fossero più reattivi al PDGFr, al contrario, coloro affetti dalla variante limitata presentassero autoanticorpi diretti contro NOX.

4.2.1 Confronto tra i due gruppi di pazienti (G1 vs G2)

Per ciascuno dei 140 peptidi è stato applicato il test di Mann-Whitney-Wilcoxon, ed è stata evidenziata, solamente per i peptidi **PEP75** e **PEP77** una maggiore reattività del gruppo dei pazienti con dsSSc rispetto a quella dei pazienti con lsSSc, con una significatività osservata pari rispettivamente a **0.0342** e **0.0303**.

Questo suggerisce che l'importante significatività statistica osservata per PEP75 è da imputare al fatto che questo peptide viene legato in maniera spiccata prevalentemente dai sieri del gruppo G2 (SSc diffusa).

4.2.2 Confronto tra i pazienti dsSSc (G2) e controlli (C)

Dall'analisi del confronto tra il Gruppo G2 e i sieri controllo C è emerso che il gruppo dei pazienti con dsSSc presenta una maggiore reattività per la quasi totalità della library ed in particolare per 119 peptidi sui 140 totali.

Tra questi, quelli per cui si osserva una **significatività inferiore allo 0.01 sono i peptidi PEP62**, quelli compresi tra **PEP72-PEP80 e PEP83**. Questi peptidi sono spreSSIONE del PDGFr.

Inoltre, i peptidi compresi tra PEP72-PEP80 condividono la stessa sequenza amminoacidica YEAAARQATREV: questi amminoacidi rappresentano uno dei motivi che compongono il sito di legame di autoanticorpi dotati di attività biologica.

Risultano non significativi i peptidi PEP15, PEP17, PEP20, PEP31, PEP37-38-39, PEP69-70, PEP84-85-86-87, PEP108-109-110, PEP112-113-114, PEP119.

4.2.3 Confronto tra i pazienti con lsSSc (G1) e controlli (C)

Dal confronto tra i pazienti con Sclerosi cutanea limitata e il gruppo controllo non sono emerse differenze statisticamente significative per nessuno dei 140 peptidi.

4.2.4 Box plot Gruppi Controlli, G1, G2

Proseguendo con l'analisi grafica dei tre gruppi, è risultata evidente l'esistenza di un'importante variabilità nella distribuzione del Gruppo 1 e nel Gruppo 2, tale da ipotizzare la possibilità di una ulteriore suddivisione dei pazienti in sottogruppi di studio.

- CONTROLLI
- GRUPPO 1: pazienti affetti da sclerosi cutanea limitata
- GRUPPO 2: pazienti affetti da sclerosi cutanea diffusa

Nella figura sottostante (*figura 11*) vengono presentati i diagrammi scatola e baffi per i tre gruppi:

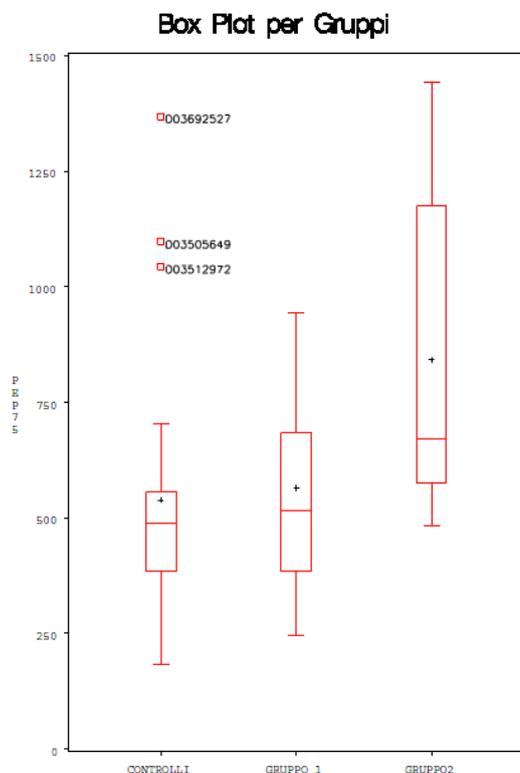


Figura 11: Box and whisker plot per la variabile PEP75.

Nel gruppo CONTROLLI si osservano dei valori anomali (outliers) che si istaccano dal gruppo.

Le scatole e i baffi del GRUPPO1 e GRUPPO2 sono estremamente allungate, segno di una importante variabilità all'interno del gruppo.

Tale grafico è stato prodotto per ciascuno dei 140 peptidi al fine di ottenere una rappresentazione grafica della reattività di ciascun gruppo nei confronti di ogni singolo peptide. Il gruppo dei controlli si pone sempre inferiore rispetto al gruppo 2. Il gruppo dei pazienti con lsSSc si pone sempre in una posizione intermedia.

E' interessante osservare che le scatole e i baffi del gruppo1 e del gruppo2, sono estremamente allungate, segno di una importante variabilità all'interno dei gruppi. Questo ci ha deciso di procedere con una analisi di Cluster, volta a poter individuare dei sottogruppi di distribuzione.

4.3 Cluster Analysis, analisi delle componenti principali e divisione dei pazienti in sottogruppi

Dalla precedente analisi è risultato evidente che all'interno dei gruppi prestabiliti (GRUPPO1 e GRUPPO2) esistesse un'importante variabilità, a favore dell'ipotesi che potessero essere presenti dei sottogruppi di studio. Abbiamo ritenuto opportuno, pertanto, procedere con un'analisi preliminare, detta cluster analysis volta all'identificazione, tramite dendrogramma, di sottogruppi omogenei che unissero insieme le osservazioni "più vicine" e le separassero dalle "più distanti".

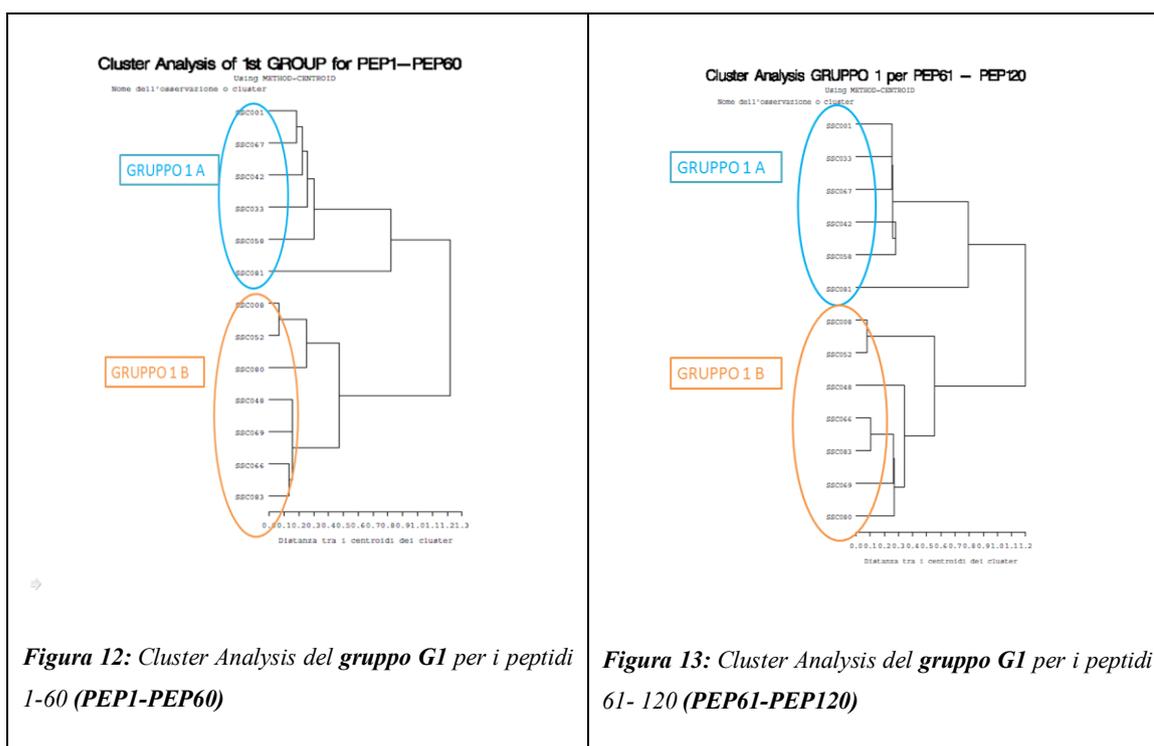
Abbiamo così ottenuto i seguenti raggruppamenti:

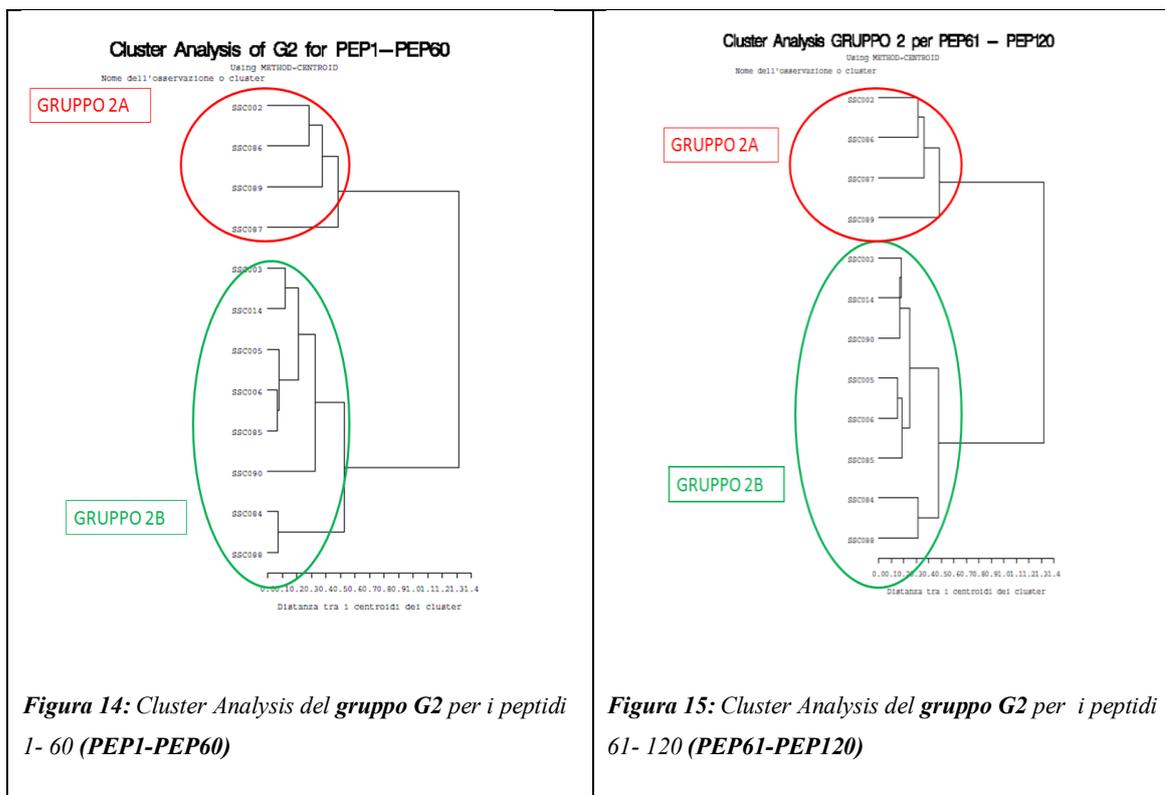
Figura 12: Cluster Analysis del gruppo G1 per i peptidi 1-60

Figura 13: Cluster Analysis del gruppo G1 per i peptidi 61-120

Figura 14: Cluster Analysis del gruppo G2 per i peptidi 1-60

Figura 15: Cluster Analysis del gruppo G2 per i peptidi 61-120





E' quindi evidente che all'interno del Gruppo 1 sono presenti due sottogruppi di pazienti:

- **GRUPPO 1A:** SSC001, SSC033, SSC042, SSC058, SSC067, SSC081
- **GRUPPO 1B:** SSC008, SSC048, SSC052, SSC066, SSC069, SSC080, SSC083

Lo stesso vale per il Gruppo 2:

- **GRUPPO 2A:** SSC002, SSC086, SSC087, SSC089
- **GRUPPO 2B:** SSC003, SSC005, SSC006, SSC014, SSC084, SSC085, SSC088, SSC090

Successivamente, per confermare quanto abbiamo osservato dall'analisi dei cluster, è stata eseguita l'analisi delle componenti principali che, ricordiamo, ha l'obiettivo di ridurre il numero di variabili in poche variabili tra loro

incorrelate e che spieghino tutta la variabilità osservata, salvo un margine trascurabile di errore.

Tramite PCA (Principal Components Analysis), applicando il metodo della covarianza, sono state quindi calcolate le due variabili di sintesi:

- PRIN1: variabile espressiva di PEP1 - - PEP60, esprime il 97% della varianza totale delle reattività dei sieri nei confronti dei peptidi NOX;

- PRIN2: variabile espressiva di PEP61 - - PEP120, esprime il 95% della varianza totale delle reattività dei sieri nei confronti dei peptidi PDGFr.

Queste due variabili sono state poi plottate su un diagramma a dispersione XY per valutare come si distribuivano le reattività dei sieri appartenenti, rispettivamente, al GRUPPO 1 e al GRUPPO 2.

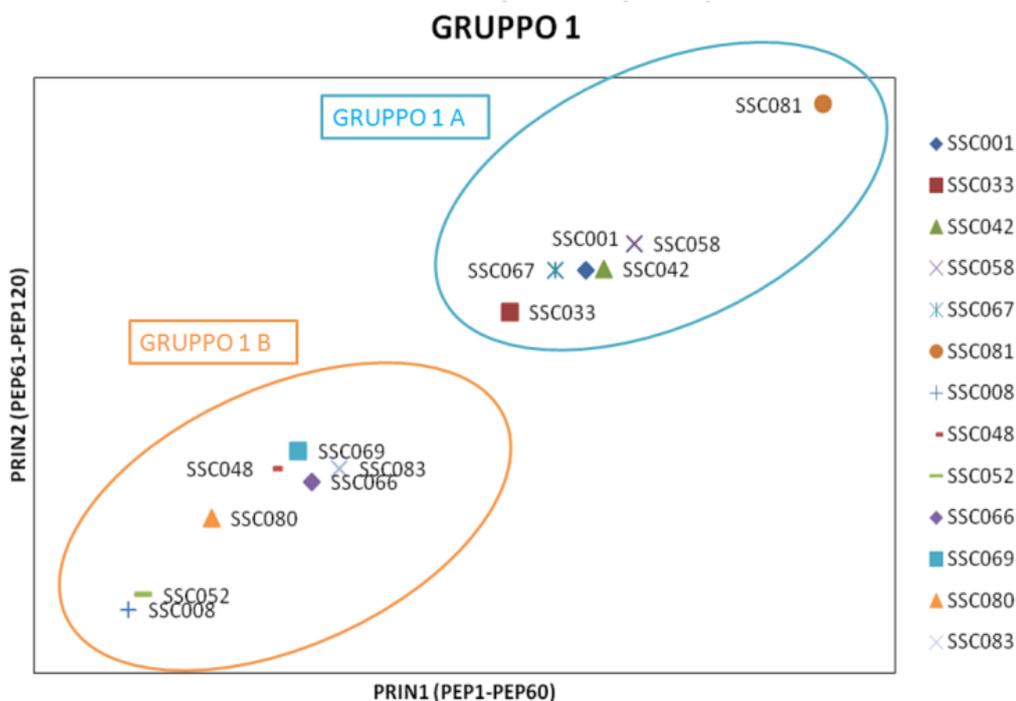


Figura 16: Analisi delle componenti principali per il Gruppo 1 (G1)

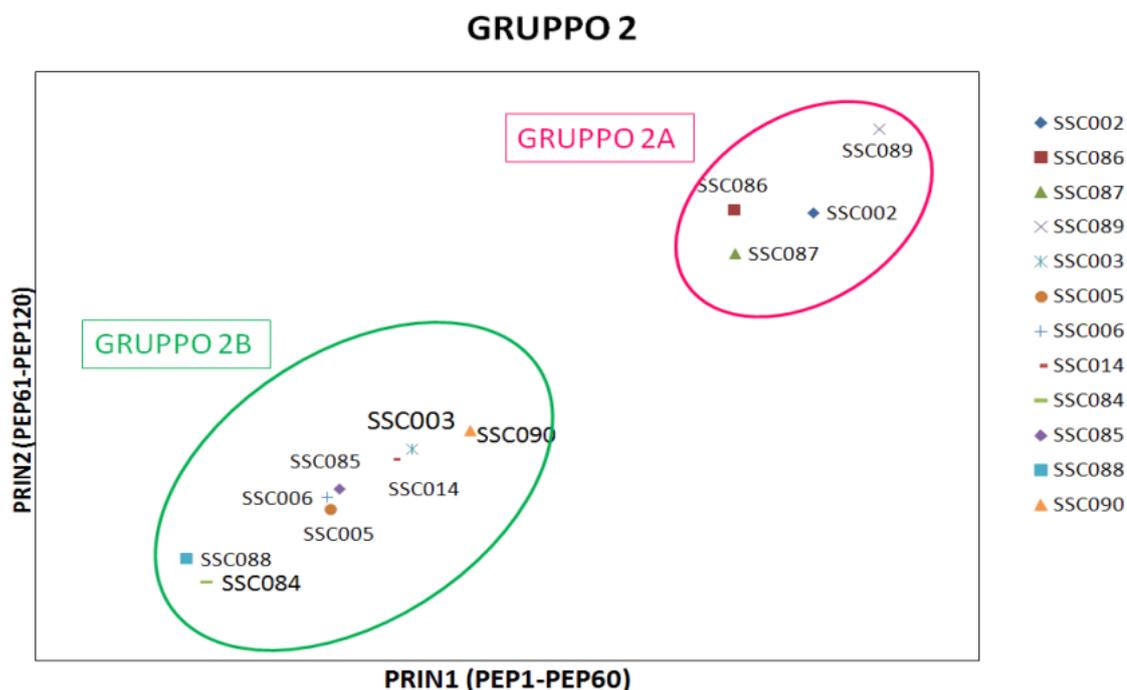


Figura 17: Analisi delle componenti principali per il Gruppo 2 (G2)

Dalle Figure 16 e 17 appare chiara la disposizione per sottogruppi di osservazioni a conferma di ciò che avevamo osservato nella Cluster Analysis.

Anche in questo caso, nel Gruppo 1: G1A i pazienti SSC001, SSC033, SSC058, SSC067, SSC081 si comportano diversamente rispetto ai pazienti G1B SSC008, SSC048, SSC052, SSC066, SSC069, SSC080, SSC083. I sieri appartenenti gruppo 1A, infatti, si dispongono in alto a destra nello scatter plot, ciò significa che questi pazienti sono più reattivi sia ai peptidi NOX (PRIN1) sia ai peptidi PDGFr (PRIN2).

Per il Gruppo 2 è ugualmente confermata la suddivisione nei sottogruppi G2A e G2B. I pazienti del gruppo G2A (SSC002, SSC086, SSC087, SSC089) sono più reattivi sia a NOX che al PDGFr, disponendosi in alto a destra nel grafico a dispersione.

Una volta accertata la presenza dei sottogruppi è stato possibile procedere con il confronto dei vari sottogruppi con il gruppo controllo.

4.3.1 Confronto tra sottogruppi

Confronto tra controlli e gruppo G1A

Dal confronto tra il gruppo G1A (pazienti affetti da Sclerosi cutanea limitata più reattivi) e il gruppo dei controlli mediante test di Mann-Whitney-Wilcoxon è emerso che i sieri dei pazienti G1A risultano sempre più reattivi dei controlli (p-value < 0.05), ad eccezione di **PEP70**, **PEP84** , **PEP87** . In particolare la massima differenza è stata riscontrata per il peptide **PEP63** con una significatività osservata inferiore allo 0.001.

Confronto tra controlli e gruppo G1B

Non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa nel confronto tra il gruppo G1B e il gruppo controlli. La reattività dei sieri di pazienti inclusi in questo gruppo è sovrapponibile a quella dei sieri controllo.

Confronto tra controlli e gruppo G2A

Dal confronto tra G2A e i controlli è emerso che il gruppo dei pazienti ha una reattività maggiore rispetto ai controlli in maniera estremamente significativa (p-value < 0.00) nei confronti di tutti i peptidi contenuti nella library a dimostrazione della importante reattività dei sieri di questi pazienti.

Confronto tra controlli e gruppo G2B

Il gruppo G2B ha dimostrato una maggiore reattività rispetto ai controlli solo per PEP75 (p-value 0.03)

Confronto tra G1A e G1B

Nell'ambito della suddivisione all'interno del gruppo di pazienti affetti da Sclerosi cutanea limitata, il gruppo G1A ha registrato una reattività

superiore al G1B nei confronti di tutti i peptidi (PEP1—PEP140) con una significatività osservata ≤ 0.01 .

Confronto tra G2A e G2B

Allo stesso modo, all'interno del gruppo di pazienti affetti da Sclerosi cutanea diffusa, il gruppo G2A ha registrato una reattività superiore al G2B nei confronti di tutti i peptidi (PEP1—PEP140) con una significatività osservata ≤ 0.01 .

Confronto tra G1A e G2A

Nel confronto tra i sieri più reattivi dei pazienti con lsSSc (G1A) e i sieri più reattivi dei pazienti con dsSSc (G2A), questi ultimi hanno dimostrato sempre una reattività statisticamente più significativa dei primi, fatta eccezione per i peptidi che vanno da PEP121 a PEP140, che erano stati inseriti nella library come peptidi controllo. Ciò dunque conferma l'ipotesi della maggiore reattività dei sieri appartenenti al gruppo G2A.

Confronto tra G1B e G2B

Allo stesso modo abbiamo confrontato i sieri meno reattivi dei pazienti affetti da lsSSc con quelli meno reattivi dei pazienti affetti dalla forma dsSSc. Anche in questo caso, i pazienti del gruppo 2B, seppur meno reattivi all'interno del loro gruppo, sono risultati più reattivi rispetto ai pazienti del gruppo 1B, ad eccezione dei peptidi PEP5, PEP9, PEP15, PEP37, PEP40, PEP50, PEP56, PEP57, PEP61, PEP63, PEP64, PEP65, PEP66, PEP67, PEP69, PEP109, PEP111, PEP113. In particolare, i peptidi per i quali si è registrata una reattività spiccatamente differente ($p\text{-value} < 0.01$) sono quelli che vanno da PEP 72 a PEP 81.

Confronto tra G1A e G2B

Nel confronto tra i sieri più reattivi del gruppo 1 e quelli meno reattivi del gruppo 2, i primi hanno dimostrato una maggiore reattività con una

significatività osservata. Pertanto, tra i pazienti affetti dalla forma limitata di malattia, quelli del gruppo 1A sono più reattivi di quelli che presentano la malattia in forma diffusa ma appartengono al gruppo 2B.

4.3.2 Box plot di confronto tra i cinque gruppi: CONTROLLI, G1A, G1B, G2A, G2B

Box Plot per Gruppi

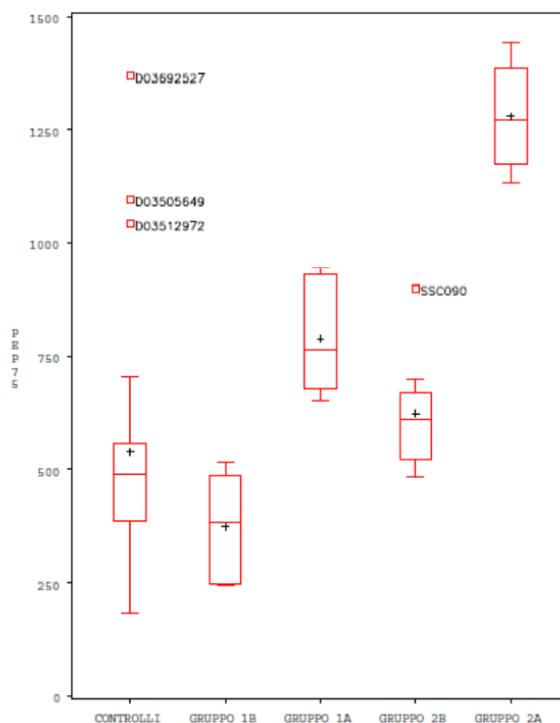


Figura 18: Box plot di PEP75

Dal confronto di tutti i cinque gruppi, per i peptidi per i quali è stata registrata una reattività statisticamente maggiore rispetto ai controlli, possiamo concludere che:

- Il gruppo G2A è quello per cui si registra sempre la più alta reattività. Questo è vero per tutti i peptidi (anche quelli che vanno da 121 a 140), segno che questi sieri sono dotati di autoanticorpi estremamente reattivi che legano anche le sequenze che sono state inserite come controllo.

- In termini di reattività, segue il gruppo G1A. Esso è costituito dai sieri più reattivi dei pazienti affetti dalla variante limitata di malattia. Questo gruppo si presenta più reattivo anche del gruppo G2B, potendo indicare questo, una maggiore aggressività clinica di malattia di questi pazienti, associata a prognosi peggiore, nonostante affetti dalla forma limitata.
- Al contrario, il gruppo G2B, pur essendo costituito da individui affetti da Sclerosi Diffusa, presenta una scarsa reattività. Ciò potrebbe essere indicatore di una minore aggressività della malattia. Il gruppo G2B, comunque, resta più reattivo dei controlli.
- Il gruppo G1B, infine, è quello per il quale abbiamo osservato la minore reattività in assoluto, inferiore anche al gruppo Controllo.

4.4 Determinazione di un valore cut off per i peptidi più significativi

Ricordiamo che il valore cut off viene definito come quel punteggio che ha una buona capacità di discriminazione in un test, tale che se il test risulti essere inferiore a questo valore, allora sarà considerato test negativo, altrimenti sarà test positivo.

A conclusione del nostro studio abbiamo cercato di individuare dei valori cut off per quei peptidi che nella prima analisi si erano dimostrati i migliori a discriminare i pazienti dai controlli, ovvero PEP8 e PEP9 e PEP61 e PEP75.

I valori cut off sono stati calcolati mediante software statistico il cui output fornisce la curva ROC e i valori di sensibilità e $(1 - \text{specificità})$ per ogni possibile punteggio di cut-off.

Lo scopo è quello di poter sviluppare in futuro dei test epitope-based utili nella diagnosi di malattia.

Di seguito si riportano le curve Roc per ciascuno dei peptidi in esame: PEP8, PEP9 (espressione di NOX), PEP61 e PEP75 (PDGFr).

PEP8: VALORE CUT OFF = 402

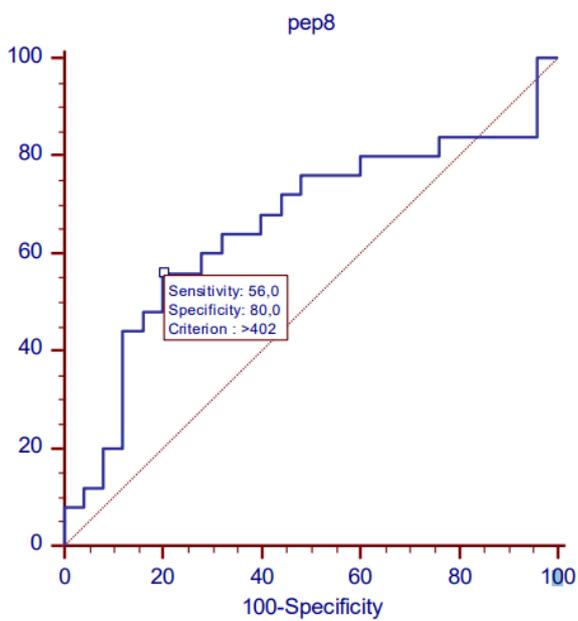


Figura 19: Curva ROC del **Peptide 8** (espressione di NOX). **Valore cut off scelto pari a 402.** AUC=0.65. 95% Confidence interval [0.508-0.784], p-value=0.04.

PEP9: VALORE CUT OFF = 410

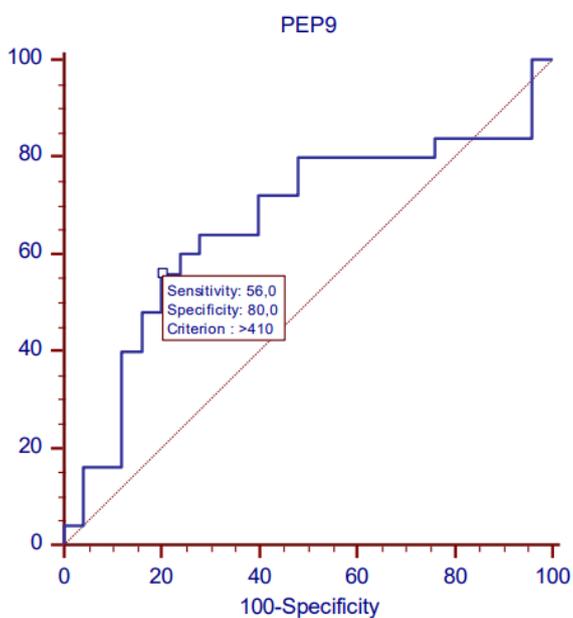


Figura 20: Curva ROC del **Peptide 9** (espressione di NOX). **Valore cut off scelto pari a 410.** AUC=0.662. 95% Confidence interval [0.515-0.79], p-value=0.03.

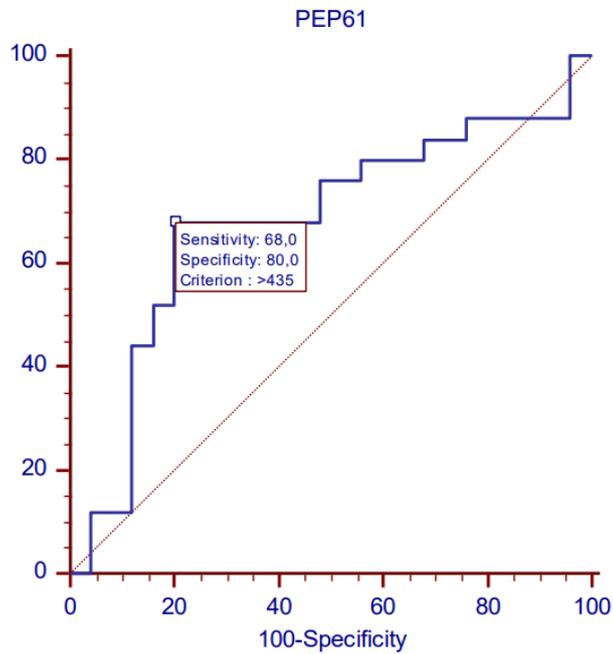
PEP61: VALORE CUT OFF = 435

Figura 21: Curva ROC del **Peptide 61** (PDGFr). Valore cut off scelto pari a 435. AUC=0.678. 95% Confidence interval [0.531-0.803], p-value=0.01.

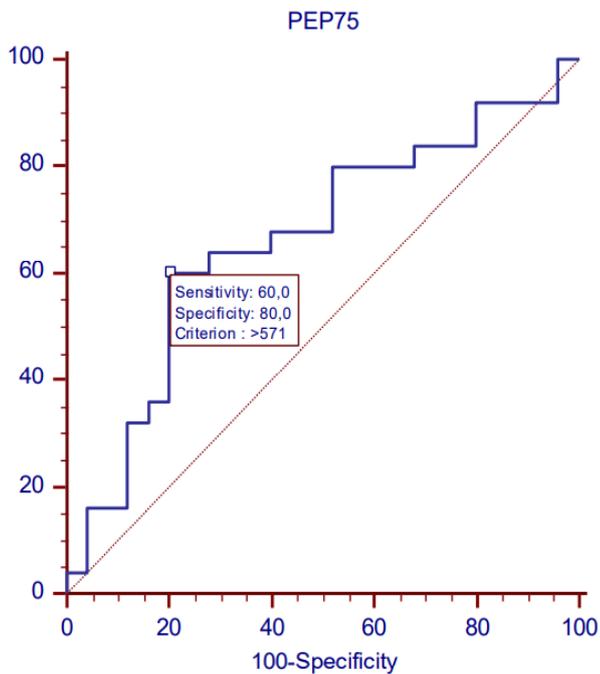
PEP75: VALORE CUT OFF = 571

Figura 22: Curva ROC del **Peptide 75** (PDGFr). Valore cut off scelto pari a 571. AUC=0.664. 95% Confidence interval[0.516-0.791], p-value=0.0 .

CONFRONTO CURVE ROC

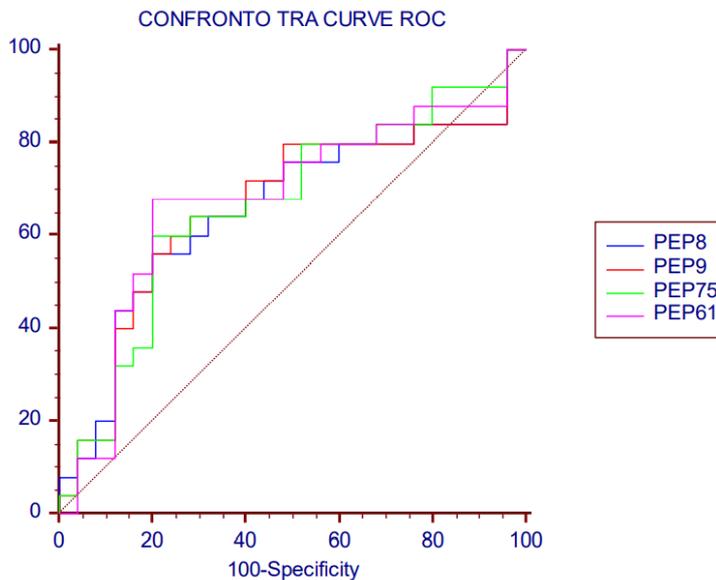


Figura 23: confronto tra le quattro curve Roc. Il punteggio cut off di 435 scelto per il PEP61 è quello che discrimina meglio in termini di sensibilità e specificità del test.

Con tutto ciò si rende evidente che il PEPTIDE 61 è quello che discrimina meglio tra malati e sani risultando questo il peptide per il quale si è osservata la maggiore significatività statistica.

Sono stati costruiti i quattro grafici di distribuzione delle osservazioni per i quattro peptidi più significativi con il rispettivo valore di cut off individuato.

Nella figura 24 è mostrata la distribuzione di PEP8. Anche in questo caso si ritrova la suddivisione in sottogruppi già evidenziata dalle precedenti analisi. Nel gruppo CONTROLLI si registrano 5 casi positivi che possono essere interpretati come falsi positivi, quindi errori del test diagnostico, o come individui che presentano un quadro di polireattività. Infatti, in tutte le analisi, questi soggetti hanno mostrato una reattività paragonabile a quella dei pazienti sclerodermici. Per quanto riguarda il gruppo dei pazienti, invece, i GRUPPI G1A e G2A, si posizionano entrambi spiccatamente al di sopra del valore cut off, a conferma della loro importante reattività nei confronti dei peptidi in studio. Il gruppo G1B, invece, se si utilizzasse questo test diagnostico, risulterebbe come falso negativo. Anche in questo caso potremmo interpretare questo risultato come un limite del test d'indagine,

oppure come indice della scarsa reattività dei sieri di questi pazienti che a sua volta potrebbe suggerire un quadro clinico più sfumato e una prognosi migliore.

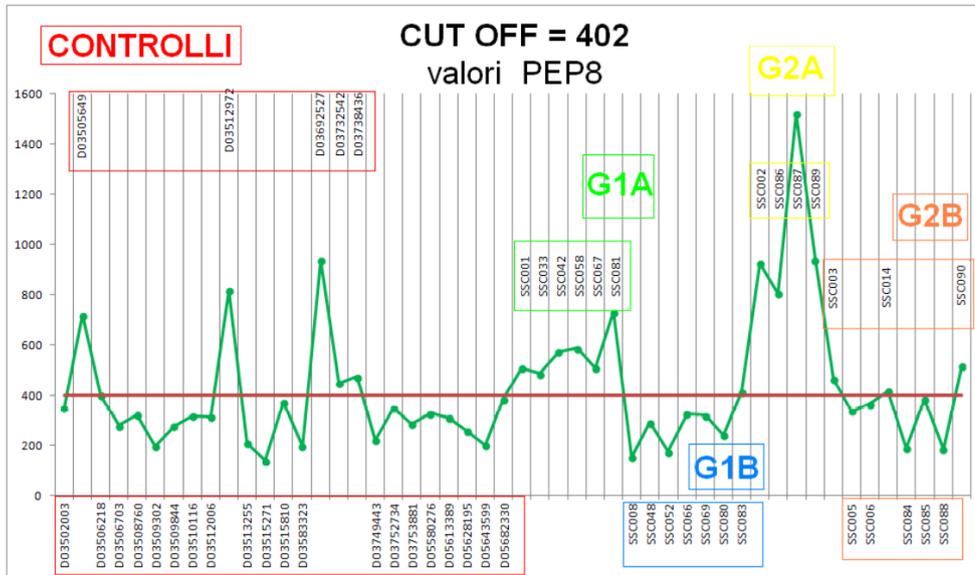


Figura 24: Distribuzione delle reattività per il PEPTIDE 8

Nella figura 25 si osserva che anche per il PEPTIDE 9 si evidenzia la stessa distribuzione del PEPTIDE 8 ad eccezione del paziente SSc014 che in questo caso si pone al limite del valore cut off scelto.

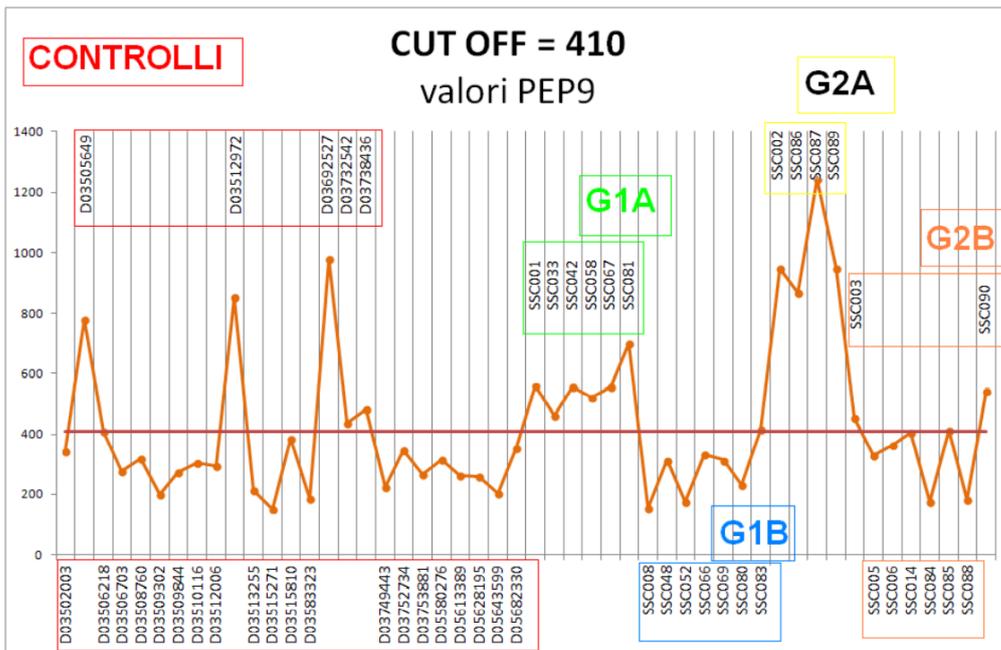


Figura 25: Distribuzione delle reattività per il PEPTIDE 9

Nella figura 26 si osserva che il PEPTIDE 61 è quello che discrimina meglio tra malati e sani e ciò è in accordo con il fatto che nella precedente analisi di confronto è stato il peptide per il quale si è osservata la maggiore significatività statistica. Per esso, infatti, la distribuzione dei controlli resta uguale a quella degli altri peptidi, mentre, i pazienti sclerodermici hanno una reattività maggiore di quella osservata per gli altri peptidi e anche due pazienti appartenenti al gruppo G1B sembrano rispondere a questo peptide, localizzandosi al di sopra del valore cut off.

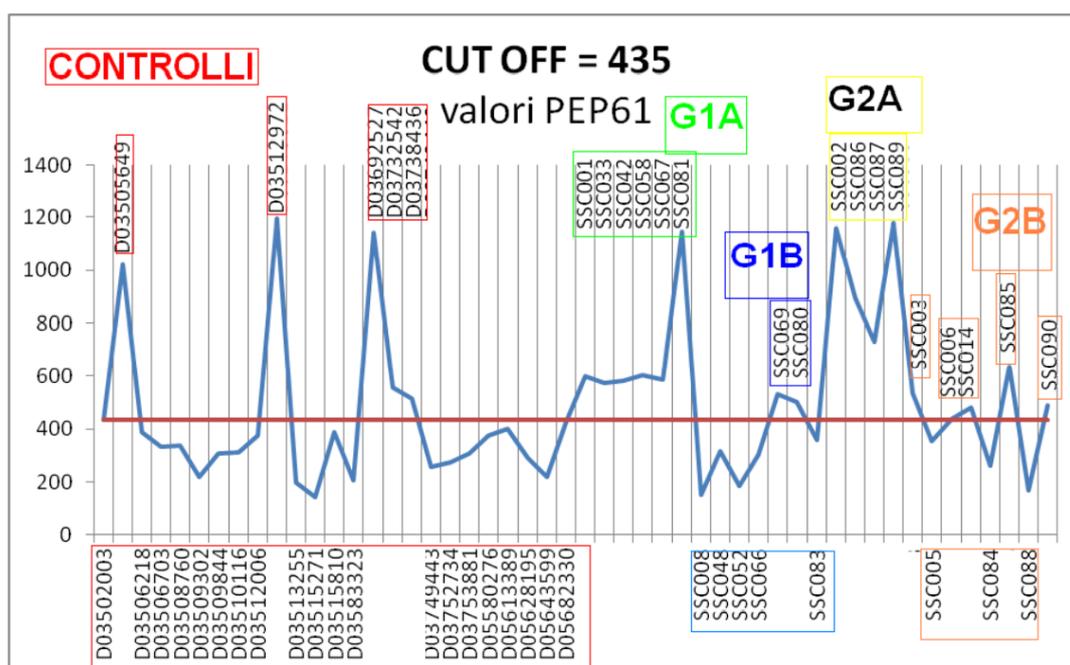


Figura 26: Distribuzione delle reattività per il PEPTIDE 61

Nella figura 27 si osserva invece che per il peptide 75, si ritorna alla distribuzione osservata per il peptide 8 e il peptide 9, ad eccezione del gruppo G2B che sembra essere più reattivo con solo tre falsi negativi (SSC005, SSC084, SSC085). In questo caso, i pazienti del gruppo G1B sono tutti al di sotto del valore cut off.

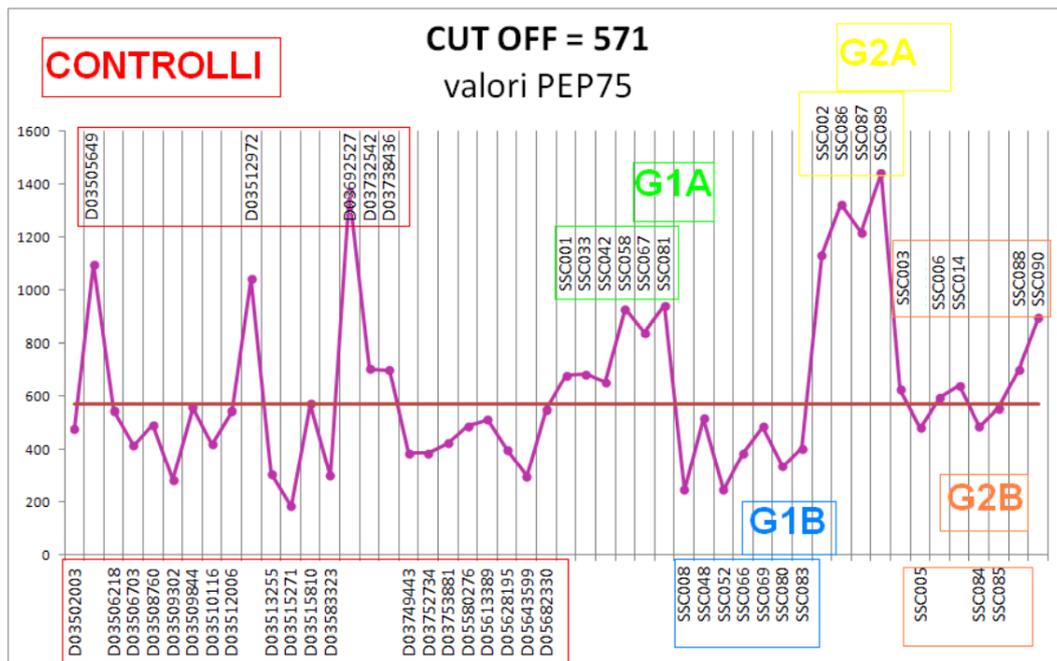


Figura 27: Distribuzione delle reattività per il PEPTIDE 75

Discussione

La sclerosi sistemica è una malattia rara del tessuto connettivo la cui eziopatogenesi non è ancora completamente chiarita. Il decorso clinico, il coinvolgimento dei vari organi interni, il coinvolgimento cutaneo e la possibile evoluzione non è ancora prevedibile, unica osservazione è una discreta associazione, per quanto riguarda la prognosi, con i vari subset autoanticorpali. Allo stato attuale inoltre, non esiste un saggio diagnostico precoce, dei biomarker affidabili di malattia e fin'ora nessuna terapia si è dimostrata efficace nel modificare in maniera significativa la storia naturale della malattia.

Dopo la scoperta da parte del gruppo di ricerca del Prof Gabrielli della presenza di anticorpi anti-recettore del PDGF nel siero dei pazienti sclerodermici, della loro capacità di indurre in vitro stress ossidativo con deposizione di collagene nel connettivo, si è voluto approfondire lo studio dei meccanismi patogenetici che conducono allo sviluppo della Sclerosi Sistemica.

L'obiettivo è stato quello di definire quali erano le regioni del recettore del PDGF coinvolte nell'innescare dei circuiti di segnale intracellulari in conseguenza del legame con fattori fisiologicamente presenti (la citochina PDGF) o di fattori patogeni come gli autoanticorpi anti-recettore del PDGF.

Grazie al clonaggio di autoanticorpi da cellule B memoria di pazienti sclerodermici, sono stati identificate sottoclassi di anticorpi anti-PDGFR umano dotate di attività biologica e quindi correlate con lo sviluppo della malattia. In seguito, le analisi condotte in silico e la costruzione di una library peptidica del PDGFR α umano hanno reso possibile l'identificazione dell'epitopo del recettore riconosciuto da ciascun autoanticorpo, mettendo in luce le differenze tra anticorpi stimolanti e non stimolanti, e la costruzione di una mappa funzionale della regione extracellulare del PDGFR α umano.

Grazie al servizio fornito dalla Pepscan Presto, Lelystat, Olanda, è stata generata una specifica library peptidica allo scopo di valutare clinicamente il legame tra gli epitopi conformazionali del PDGFR e gli autoanticorpi presenti nel siero di pazienti sclerodermici e di identificare quali tra questi epitopi fossero il bersaglio di una maggiore reattività dei sieri. Per fare ciò sono stati studiati 25 sieri, risultati positivi con un test ELISA già ottimizzato, di pazienti sclerodermici afferenti al reparto di Clinica medica di Ancona (13 dei quali affetti dalla forma cutanea limitata di malattia e 12 dalla variante cutanea diffusa), e 25 sieri controllo. In aggiunta ai 60 peptidi espressione dei primi tre domini della porzione extracellulare del PDGFR, la library contiene anche 60 peptidi rappresentanti la proteina NOX-2 appartenente alla famiglia delle NADPH ossidasi, responsabile della produzione di ROS. Secondo la nostra ipotesi, infatti, sia la proteina NOX-2 che il PDGFR rappresentano il bersaglio della risposta autoimmune da parte dei pazienti affetti da SSc.

Dall'analisi dei risultati è stata messa in evidenza una differente reattività dei sieri dei pazienti SSc rispetto ai sieri controllo nei confronti di alcuni peptidi contenuti nella library. Ciò dimostra che i sieri dei pazienti sclerodermici contengono autoanticorpi che riconoscono epitopi conformazionali specifici, ed in particolare 13 di essi appartenenti a NOX2 e 21 al PDGFR. Tra i peptidi che sono risultati statisticamente significativi è poi stato possibile identificarne alcuni (PEP8-PEP9-PEP61-PEP75) che riescono a discriminare in maniera più marcata i pazienti dai controlli e che potrebbero rappresentare in futuro possibili bersagli di test diagnostici epitope-based.

Partendo dal meccanismo patogenetico per cui l'aumentata produzione di collagene di tipo I da parte dei fibroblasti dei pazienti sclerodermici con forma diffusa sarebbe legata alla presenza di autoanticorpi stimolanti il PDGFR^(76,92), mentre nei pazienti con sclerosi limitata, la minore fibrosi

cutanea e sistemica potrebbe essere spiegata con una risposta autoimmunitaria prevalente nei confronti di NOX-2. E' stata formulata l'ipotesi, al momento della costruzione della library, che i pazienti con variante diffusa fossero più reattivi al PDGFr, mentre, coloro affetti dalla variante limitata presentassero autoanticorpi diretti contro NOX.

Abbiamo quindi condotto delle analisi separate per valutare se ci fossero delle differenze tra i differenti subset di malattia tra i pazienti affetti da sclerosi cutanea limitata e quelli affetti dalla forma diffusa di malattia.

Confrontando i due gruppi SSc limitata (G1) e SSc diffusa (G2) ed il gruppo dei controlli è risultato che:

- I sieri dei pazienti affetti dalla variante diffusa di malattia (G2) sono più reattivi dei sieri dei pazienti affetti dalla forma limitata (G1) solo nei confronti dei peptidi PEP75 e del PEP77. Questo suggerisce che l'importante significatività statistica osservata per PEP75 è da imputare al fatto che questo peptide viene legato in maniera spiccata prevalentemente dai sieri del gruppo G2.
- Nel confronto tra il gruppo G2 e i controlli, i pazienti presentano una maggiore reattività per la quasi totalità dei peptidi presenti nella library e, in particolare, i peptidi PEP62, PEP83 e quelli compresi tra PEP72 - PEP80 sono quelli per i quali si è registrata una significatività inferiore allo 0.01. Questi peptidi sono espressione del PDGFr.
- Inoltre, i peptidi compresi tra PEP72 - PEP80 condividono la stessa sequenza amminoacidica YEAAARQATREV: questi amminoacidi rappresentano uno dei motivi che compongono il sito di legame di autoanticorpi dotati di attività biologica.
- Dal confronto tra il gruppo G1 e i controlli, infine, non sono emerse differenze statisticamente significative.

Proseguendo con l'analisi grafica dei tre gruppi (figura 11), è risultata evidente l'esistenza di un'importante variabilità nella distribuzione del

Gruppo 1 e nel Gruppo 2, tale da ipotizzare la possibilità di una ulteriore suddivisione dei pazienti in sottogruppi di studio. Questa osservazione è stata poi confermata dall'analisi dei cluster ottenendo quindi un nuovo raggruppamento dei pazienti nei sottogruppi G1A (pazienti con SSc limitata più reattivi), G1B (pazienti con SSc limitata meno reattivi), G2A (pazienti con SSc diffusa più reattivi), G2B (pazienti con SSc diffusa meno reattivi).

Dal confronto di questi sottogruppi:

- Il gruppo G2A è quello per cui si registra sempre la più alta reattività. Questo è vero per tutti i peptidi, sia quelli compresi tra PEP1-60 (NOX), sia quelli compresi tra PEP61-120 (PDGFR), sia i peptidi controllo, segno che questi pazienti sono dotati di una polireattività che potrebbe giustificare una malattia più aggressiva.
- Segue, in termini di reattività, il gruppo G1A. Questo gruppo, pur essendo formato da pazienti affetti dalla forma limitata di malattia, in realtà ha registrato una reattività maggiore del gruppo G2B, costituito da pazienti affetti dalla forma diffusa. Effettivamente, andando a analizzare le caratteristiche cliniche dei pazienti del gruppo G1A, è emerso che 4 pazienti su 6 presentano anticorpi Anti-Scl70, mentre nessuno di essi presenta gli anticorpi anticentromero. Inoltre, rispetto al gruppo G1B, ugualmente costituito da pazienti affetti da SSc limitata, essi presentano una malattia più aggressiva, con un maggiore interessamento d'organo o di esordio recente. Più difficile, invece, rilevare delle differenze con i pazienti del gruppo G2B. Sarà dunque utile, in futuro, cercare di meglio caratterizzare questi gruppi dal punto di vista clinico mediante il ricorso a uno studio di follow up.
- In ultimo, dopo il G2A, G1A e G2B, troviamo il gruppo G1B. Questo gruppo è risultato essere meno reattivo anche dei controlli. Andando a studiare le caratteristiche cliniche dei pazienti è importante notare

che essi presentano tutti una storia di malattia ormai spenta o non progressiva o di recente esordio che non ha ancora mostrato segni di un interessamento d'organo. Questo potrebbe essere indicatore di una forma di malattia a minore aggressività clinica e/o associata a una prognosi migliore. E' evidente che anche in questo caso sarà necessario il ricorso a uno studio di follow up che dia un fondamento statisticamente valido a queste osservazioni.

A conclusione del nostro studio abbiamo cercato di individuare dei valori cut off per quei peptidi che nella prima analisi si erano dimostrati i migliori a discriminare i pazienti dai controlli, ovvero PEP8 e PEP9 (espressione di NOX), PEP61 e PEP75 (espressione del PDGFr). Lo scopo è quello di poter sviluppare in futuro dei test epitope-based utili nella diagnosi di malattia. Abbiamo quindi separato la popolazione sulla base dei punteggi ottenuti mediante la costruzione delle curve Roc. Dal loro confronto è emerso che il valore cut-off di PEP61 pari a 435 è quello a cui è associata la più alta sensibilità e specificità (se= 68%, sp= 80%). Nonostante una numerosità campionaria troppo esigua per trarre delle conclusioni statisticamente significative, non si può non domandarsi come mai, indipendentemente dal punteggio cut off considerato, cinque individui appartenenti al gruppo controlli (D03505649, D03512972, D03692527, D03732542, D03738436) si posizionino sempre al di sopra del livello soglia, risultando sempre positivi a un ipotetico test diagnostico. In particolare tre di essi (D03505649, D03512972, D03692527) presentano una reattività estremamente elevata a tutti i peptidi contenuti nella library, con un comportamento paragonabile ai pazienti del gruppo G2A. Questo dato, ci fa domandare se questa polireattività sierica possa essere espressione di una familiarità verso malattie autoimmuni o addirittura di una malattia in forma latente e non ancora manifesta, pertanto in questi pazienti risulta fondamentale il follow-up clinico per poter cogliere precocemente i primi segni di comparsa di malattia.

Conclusione

La sclerosi sistemica è una patologia a eziopatogenesi ancora poco chiara, ma la scoperta della presenza di autoanticorpi anti-PDGFr nel siero di pazienti sclerodermici e la loro capacità di indurre stress ossidativo e deposizione di collagene potrebbe avere importanti implicazioni sia dal punto di vista diagnostico che terapeutico.

In questo lavoro di ricerca, sono stati individuati specifici epitopi conformazionali che rappresentano il sito di legame tra anticorpi anti-PDGFr con i sieri di pazienti SSc. In aggiunta a questi risultati, un dato che meriterà un approfondimento futuro è l'osservazione di una diversa reattività dei sieri SSc al recettore del PDGF sulla base della quale è stato possibile fare una suddivisione dei pazienti in sottogruppi in parte diversi rispetto alla tradizionale classificazione basata sull'estensione della fibrosi cutanea (forma diffusa vs limitata). Questo purtroppo conferma l'attuale difficoltà di classificazione dei malati sclerodermici che dipende dall'estrema variabilità nel decorso della malattia e che suggerisce di applicare il saggio di legame descritto in questo lavoro di tesi in uno studio multicentrico su ampie coorti di pazienti al fine di validare questa riclassificazione basata sulla risposta autoimmunitaria verso PDGFR alfa e/o NOX-2. Merita inoltre una considerazione a parte, il riscontro che indipendentemente dal punteggio cut off considerato, cinque individui appartenenti al gruppo controlli presentano una reattività estremamente elevata a tutti i peptidi contenuti nella library, con un comportamento paragonabile ai pazienti del gruppo con sclerosi cutanea diffusa. Questo dato, ci fa domandare se questa polireattività sierica possa essere espressione di una familiarità verso malattie autoimmuni o addirittura di una malattia in forma latente e non ancora manifesta, pertanto in questi pazienti risulta fondamentale il follow-

up clinico per poter cogliere precocemente i primi segni di comparsa di malattia. Tutto ciò è estremamente importante perché, se queste osservazioni verranno confermate da studi su una più ampia numerosità campionaria, questi peptidi potranno rappresentare il bersaglio non solo di specifici test diagnostici epitope-based, ma soprattutto potranno essere bersaglio di mirate terapie molecolari volte ad arrestare il meccanismo responsabile dello stress ossidativo e della fibrosi in corso di Sclerosi Sistemica.

Bibliografia

- [1] **Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T:** Scleroderma. *N Engl J Med* 2009, 360: 1989–2003
- [2] **Wollheim FA et al** Classification of systemic sclerosis. Visions and reality. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Oct; 44 (10): 1212-6
- [3] **Chiffrot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J.** Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* 2008;37:223–235.
- [4] **Reveille JD.** Ethnicity and race and systemic sclerosis: how it affects susceptibility, severity, antibody genetics, and clinical manifestations. *Curr Rheumatol Rep* 2003;5:160–167.
- [5] **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 Jun;44(6):1359-62.
- [6] **Luo Y, Wang Y, Wang Q, Xiao R, Lu Q.** Systemic sclerosis: genetics and epigenetics. *J Autoimmun*. 2013 Mar;41:161-7.
- [7] **Broen JC, Radstake TR, Rossato M.** The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Nov;10(11):671-81.
- [8] **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 Jul;62(7):2109-16.
- [9] **Morel PA, Chang HJ, Wilson JW, Conte C, Falkner D, et al.** HLA and ethnic associations among systemic sclerosis patients with anticentromere antibodies. *Hum Immunol*. 1995 Jan;42(1):35-42
- [10] **Reveille JD, Durban E, MacLeod-St Clair MJ, Goldstein R, Moreda R, et al.** Association of amino acid sequences in the HLA-DQB1 first domain with antitopoisomerase I autoantibody response in scleroderma (progressive systemic sclerosis). *J Clin Invest*. 1992 Sep;90(3):973-80.
- [11] **Gilchrist FC, Bunn C, Foley PJ, Lympany PA, Black CM, et al.** Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP. *Genes Immun*. 2001 Apr;2(2):76-81.

- [12] **Ciechomska M, van Laar JM, O'Reilly S.** Emerging role of epigenetics in systemic sclerosis pathogenesis. *Genes Immun* 2014;15:433–9.
- [13] **Jungel A, Distler JH, Gay S, Distler O.** Epigenetic modifications: novel therapeutic strategies for systemic sclerosis? *Expert Rev Clin Immunol* 2011;7:475–80.
- [14] **Jimenez SA, Piera-Velazquez S.** Potential role of human-specific genes, human-specific microRNAs and human-specific non-coding regulatory RNAs in the pathogenesis of systemic sclerosis and Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2013;12:1046–51.
- [15] **Hedrich CM, Rauen T.** Epigenetic patterns in systemic sclerosis and their contribution to attenuated CD70 signaling cascades. *Clin Immunol* 2012;143:1–3.
- [16] **Altorok N, Almeshal N, Wang Y, Kahaleh B.** Epigenetics, the holy grail in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology* (2014).
- [17] **Mayes MD, Bossini-Castillo L, Gorlova O, Martin JE, Zhou X, Chen WV, et al.** Immunochip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. *Am J Hum Genet* (2014) 94(1):47–61.
- [18] **Altorok N, Tsou PS, Coit P, Khanna D, Sawalha AH.** Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Ann Rheum Dis.* 2015 Aug;74(8):1612-20.
- [19] **Noda S, Asano Y, Nishimura S, Taniguchi T, Fujiu K, Manabe I, et al.** Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun.* 2014 Dec 12;5:5797.
- [20] **Ghosh AK, Mori Y, Dowling E, Varga J.** Trichostatin A blocks TGF-beta-induced collagen gene expression in skin fibroblasts: involvement of Sp1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Mar 9;354(2):420-6.
- [21] **Huber LC, Distler JH, Moritz F, Hemmatzad H, Hauser T, Michel BA, et al.** Trichostatin A prevents the accumulation of extracellular matrix in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2007 Aug;56(8):2755-64.
- [22] **Zhu H, Luo H, Li Y, Zhou Y, Jiang Y, Chai J, et al.** MicroRNA-21 in scleroderma fibrosis and its function in TGF- β -regulated fibrosis-related genes expression. *J Clin Immunol.* 2013 Aug;33(6):1100-9.

- [23] **Bhattacharyya S, Kelley K, Melichian DS, Tamaki Z, Fang F, Su Y, Feng G, et al.** Toll-like receptor 4 signaling augments transforming growth factor- β responses: a novel mechanism for maintaining and amplifying fibrosis in scleroderma. *Am J Pathol.* 2013 Jan;182(1):192-205.
- [24] **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 Jun;62(6):1733-43
- [25] **Chaudhary P, Chen X, Assassi S, Gorlova O, Draeger H, Harper BE, et al.** Cigarette smoking is not a risk factor for systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2011 Oct;63(10):3098-102.
- [26] **Binns CH.** Vinyl chloride: a review. *J Soc Occup Med.* 1979 Oct;29(4):134-41. Review
- [27] **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 Feb;13(2):151-6.
- [28] **Maul GG, Jimenez SA, Riggs E, Ziemnicka-Kotula D.** Determination of an epitope of the diffuse systemic sclerosis marker antigen DNA topoisomerase I: sequence similarity with retroviral p30gag protein suggests a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 Nov;86(21):8492-6.
- [29] **Lunardi C., et al.** Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *PLoS Med.* 3, e2 (2006).
- [30] **Lunardi C, Bason C, Navone R, et al.** Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med.* 2000 Oct;6(10):1183-6.
- [31] **Farina A, Cirone M, York M, Lenna S, Padilla C, McLaughlin S, et al.** Epstein-Barr virus infection induces aberrant TLR activation pathway and fibroblast-myofibroblast conversion in scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2014 Apr;134(4):954-64.

- [32] **Shah AA, Rosen A, Hummers L, Wigley F, Casciola-Rosen L.** Close temporal relationship between onset of cancer and scleroderma in patients with RNA polymerase I/III antibodies. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2787-95.
- [33] **Moinzadeh P, Fonseca C, Hellmich M, Shah AA, Chighizola C, Denton CP, Ong VH.** Association of anti-RNA polymerase III autoantibodies and cancer in scleroderma. *Arthritis Res Ther.* 2014 Feb 14;16(1):R53.
- [34] **Joseph CG, Darrah E, Shah AA, Skora AD, Casciola-Rosen LA, Wigley FM, et al.** Association of the autoimmune disease scleroderma with an immunologic response to cancer. *Science.* 2014 Jan 10;343(6167):152-7.
- [35] **Steen V, Denton CP, Pope JE, Matucci-Cerinic M.** Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2009 Jun;48 Suppl 3:iii19-24.
- [36] **Herrick A. L.,** "The pathogenesis, diagnosis and treatment of Raynaud phenomenon," *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 8, pp. 469–479, 2012.
- [37] **Campbell P.M., LeRoy E.C.:** Pathogenesis of systemic sclerosis: a vascular hypothesis. *Semin Arthritis Rheum*, 4(4):351-368, 1975.
- [38] **Sapadin A.N., Esser A.C., Fleischmajer R.:** Immunopathogenesis of scleroderma-evolving concepts. *Mt Sinai J Med*, 68(4-5):233-242, 2001.
- [39] **Steen V. D.,** "Scleroderma renal crisis," *Rheumatic Disease Clinics of North America*, vol. 29, no. 2, pp. 315–333, 2003.
- [40] **Mouthon L., B'erezn'e A., Bussone G., No"el L., Villiger P. M., and Guillevin L.** "Scleroderma renal crisis: a rare but severe complication of systemic sclerosis," *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, vol. 40, no. 2, pp. 84–91, 2011.
- [41] **Denton CP, Black CM.** Pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2003 May;29(2):335-49, vii. Review.
- [42] **Ramirez A., Varga J.,** "Pulmonary arterial hypertension in systematic sclerosis: clinical manifestations, pathophysiology, evaluation, and management," *Treatments in Respiratory Medicine*, vol. 3, no. 6, pp. 339–352, 2004.
- [43] **Chatterjee S.,** "Pulmonary hypertension in systemic sclerosis," *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 41, no. 1, pp. 19–37, 2011.

- [44] **Sebastiani M, Manfredi A, Cassone G, Giuggioli D, Ghizzoni C, Ferri C:** Measuring Microangiopathy Abnormalities in Systemic Sclerosis Patients: The Role of Capillaroscopy-Based Scoring Models. *Am J Med Sci.* 2014 May 28
- [45] **A.A. Shah, F.M. Wigley, L. K. Hummers,** “Telangiectases in scleroderma: a potential clinical marker of pulmonary arterial hypertension,” *Journal of Rheumatology*, vol. 37, no. 1, pp. 98–104, 2010.
- [46] **M. M. El-Omar, A. P. Jenkins, K. Hollowood, A. K. Banerjee, R. P. H. Thompson,** “Gastric telangiectasis: a rare cause of severe blood loss in CREST syndrome,” *Postgraduate Medical Journal*, vol. 70, no. 822, pp. 302–304, 1994.
- [47] **B. Jharap, L. G. Koudstaal, E. A. Neefjes-Borst, S. J. B. van Weyenberg,** “Colonic telangiectasias in progressive systemic sclerosis,” *Endoscopy*, vol. 44, supplement 2, pp. E42–E43, 2012.
- [48] **E. V. Lally, S. A. Jimenez.** “Impotence in progressive systemic sclerosis” *Annals of Internal Medicine*, vol. 95, no. 2, pp. 150–153, 1981.
- [49] **S. Sukenik, J. Horowitz, D. Buskila, J. M. Abarbanel, L. Lismer, and I. Avinoach,** “Impotence in systemic sclerosis,” *Annals of Internal Medicine*, vol. 106, no. 6, pp. 910–911, 1987.
- [50] **C. Foocharoen, A. Tyndall, E. Hachulla et al.,** “Erectile dysfunction is frequent in systemic sclerosis and associated with severe disease: a study of the EULAR scleroderma trial and research group,” *Arthritis Research and Therapy*, vol. 14, no. 1, articleR37, 2012.
- [51] **C. T. Derk, S. A. Jimenez,** “Acute myocardial infarction in systemic sclerosis patients: a case series,” *Clinical Rheumatology*, vol. 26, no. 6, pp. 965–968, 2007.
- [52] **Y. Allanore, C. Meune.** “Primary myocardial involvement in systemic sclerosis: evidence for a microvascular origin,” *Clinical and Experimental Rheumatology*, vol. 28, no. 5, pp. S48–S53, 2010.
- [53] **M. Watson, R. J. Hally, P. A. McCue, J. Varga, S. A. Jimenez,** “Gastric antral vascular ectasia (watermelon stomach) in patients with systemic sclerosis,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 39, no. 2, pp. 341–346, 1996.

- [54] **K. M. Ingraham, M. S.O'Brien, M. A. X. Shenin, C. T.Derk V.D. Steen.** "Gastric antral vascular ectasia in systemic sclerosis: demographics and disease predictors" *Journal of Rheumatology*, vol. 37, no. 3, pp. 603–607, 2010.
- [55] **E.W. Hung, M. D. Mayes, R. Sharif, S. Assassi, V. I.Machicao, C. Hosing.** "Gastric antral vascular ectasia and its clinical correlates in patients with early diffuse systemic sclerosis in the SCOT trial," *Journal of Rheumatology*, vol. 40, no. 4, pp. 455– 460, 2013.
- [56] **J. Busquets, Y. Lee, L. Santamarina et al.,** "Acute retinal artery occlusion in systemic sclerosis: a rare manifestation of systemic sclerosis fibroproliferative vasculopathy," *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2013.
- [57] **M. Minasian, M. Stanford, E. Graham, C. P. Denton, C. Black.** "Bilateral ischaemic retinal vasculopathy in scleroderma," *The British Journal of Ophthalmology*, vol. 89, no. 8, pp. 1064–1065, 2005.
- [58] **Mackel AM, DeLustro F, Harper FE, LeRoy EC.** Antibodies to collagen in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1982;25:522–531.
- [59] **Gabrielli A, Montroni M, Rupoli S, Caniglia ML, DeLustro F, Danieli G.** A retrospective study of antibodies against basement membrane antigens (type IV collagen and laminin) in patients with primary and secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum* 1988;31:1432–1436.
- [60] **Heimark RL, Twardzik DR, Schwartz SM.** Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets. *Science* 1986;233:1078–1080.
- [61] **Biondi R, Coaccioli S, Lattanzi S, et al.** Oxidant/antioxidant status in patients with Raynaud's disease. *Clin Ter* 2008;159:77 81.
- [62] **Shingu M, Yoshioka K, Nobunaga M, Yoshida K.** Human vascular smoothmuscle cells and endothelial cells lack catalase activity and are susceptible to hydrogen peroxide. *Inflammation* 1985;9:309–320.
- [63] **LeRoy EC.** Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest* 1974;54:880–889.

- [64] **Uitto J, Bauer EA, Eisen AZ.** Scleroderma: increased biosynthesis of triple-helical type I and type III procollagens associated with unaltered expression of collagenase by skin fibroblasts in culture. *J Clin Invest* 1979;64:921–930.
- [65] **Ronda N., Raschi E., Testoni C., et al.:** Anti-fibroblast antibodies in systemic sclerosis. *IMAJ*, 4(11 Suppl):858-864, 2002.
- [66] **Mehra S, Walker J, Patterson K, et al.** Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* (2013) 12:340–54.
- [67] **Hamaguchi Y.:** Autoantibody profiles in systemic sclerosis: predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol.* 2010 Jan;37(1):42-53.
- [68] **Kuwana M., Kaburaki J., Mimori T. et al.:** Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 43:1074-1084, 2000.
- [69] **Khanh T Ho and John D Reveille:** The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther.* Feb 2003; 5(2): 80–93
- [70] **Arnett FC.** Is scleroderma an autoantibody mediated disease? *Curr Opin Rheumatol* (2006) 18:579–81.
- [71] **Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Avvedimento EV.** Pathogenic auto-antibodies in systemic sclerosis. *Curr Opin Immunol* (2007) 19:640–5.
- [72] **Riemekasten G, Philippe A, Näther M, Slowinski T, Müller DN, Heidecke H, et al.** Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* (2011) 70:530–6.
- [73] **Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M et al.** Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 2006 Jun 22;354(25):2667-76
- [74] **Salojin K.V., Le Tonqueze M.L., Saraux A. et al.:** Anti-endothelial cell antibodies: a useful markers of systemic sclerosis. *Am J Med*, 102:178-185, 1997.
- [75] **Renaudineau Y., Revelen R., Levy Y. et al.:** Anti-andothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6:156-160, 1999.

- [76] **Gabrielli A., Svegliati S., Moroncini G., Luchetti M., Tonnini C., Avvedimento EV:** Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor: a link to fibrosis in scleroderma and a pathway for novel therapeutic targets. *Autoimmun Rev.* ;7(2):121-6. 2007
- [77] **Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airò P, et al.** Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis.* 2010 Oct;69(10):1809-15.
- [78] **Varga, J. & Pasche, B.** Transforming growth factor β as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 200–206 (2009).
- [79] **Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Kubo, M. Tamaki, K.** Impaired SMAD7–SMURF-mediated negative regulation of TGF- β signaling in scleroderma fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 113, 253–264 (2004).
- [80] **Zhou, F. et al.** Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF- β signalling. *Nat. Commun.* 5, 3388 (2014).
- [81] **Kitaba S. et al.** Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am J Pathol.* 2012 Jan;180(1):165-76.
- [82] **Dees C. et al.** Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J Exp Med.* 2011 May 9;208(5):961-72.
- [83] **Heldin H.** Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 1992 *Comprehensive Dissection of PDGF-PDGFR Signaling.*
- [84] **Bhattacharyya S., Wei J., Varga, J.** Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 42–54 (2012).
- [85] **Heidaran MA, Pierce JH, Yu JC, et al** Role of alpha beta receptor heterodimer formation in beta platelet-derived growth factor (PDGF) receptor activation by PDGF-AB". *J. Biol. Chem* 1991.
- [86] **Claesson-Welsh L., Eriksson A., Westermarck B. and Heldin C.H.** cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type

- [87] **Trojanowska M.** Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology* 2008;47: v2-v4. PDGF receptor. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86: 4917-4921.
- [88] **Klareskog L, Gustafsson R, Scheynius A, Hällgren R.** Increased expression of platelet-derived growth factor type B receptors in the skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1534–1541.
- [89] **Zheng XY, Zhang JZ, Tu P, Ma SQ.** Expression of platelet-derived growth factor B-chain and platelet-derived growth factor beta-receptor in fibroblasts of scleroderma. *J Dermatol Sci* 1998;18:90–97
- [90]. **Trojanowska M.** Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology* 47 (Suppl. 5), v2–v4 (2008).
- [91] **Svegliati S, Canello R, Sambo P, et al.** Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J Biol Chem* 2005;280:36474– 36482
- [92] **Sambo P., Baroni S.S., Luchetti M., Paroncini P., Dusi S., Orlandini G. and Gabrielli A.** Oxydative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis and Rheumatism* 2001; 44: 2653-2664.
- [93] **Svegliati S, Canello R, Sambo P, Luchetti M, Paroncini P, Orlandini G, Discepoli G, Paterno R, Santillo M, Cuzzo C, Cassano S, Avvedimento EV, Gabrielli A** Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts
- [94] **Olson, L. E. Soriano, P.** Increased PDGFR α activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev. Cell* 16, 303–313 (2009).
- [95] **Svegliati S, Marrone G, Pezone A, Spadoni T, Grieco A, Moroncini G, et al.** Oxidative DNA damage induces the ATM-mediated transcriptional suppression of the Wnt inhibitor WIF-1 in systemic sclerosis and fibrosis. *Sci Signal.* 2014 Sep 2;7(341):ra84.

- [96] **Moroncini G, Grieco A, Nacci G, et al.** Epitope Specificity Determines Pathogenicity and Detectability of Anti-Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Autoantibodies in Systemic Sclerosis. *Arthritis & Rheumatology* Vol. 67, No. 7, July 2015, pp 1891–1903
- [97] **Murrel DF** A radical proposal for the pathogenesis of scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1993, 28:78-85.
- [98] **Piera-Velazquez S, Makul A, Jiménez SA.** Increased expression of NADPH oxidase 4 in systemic sclerosis dermal fibroblasts: regulation by transforming growth factor β . *Arthritis Rheumatol* 2015 Oct;67(10):2749-58
- [99] **Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Pomponio G, Santillo M, Avvedimento E.V.** Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: the Murrell's hypothesis revisited. *Seminars in Immunopathology*. July 2008, Volume 30, Issue 3, pp 329-337
- [100]. **Geiszt, M., Kopp, J. B., Varnai, P. and Leto, T. L.** (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8010–8014.
- [101]. **Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M** (2000) NADPH oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501.
- [102]. **LeRoy EC, Medsger TA.** Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001;28:1573–1576.
- [103] **Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, et al:** 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 2013 Nov;72(11):1747-55.
- [104] **Launay D, Remy-Jardin M, Michon-Pasturel U, et al.:** High resolution computed tomography in fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2006, 33:1789–1801.
- [105] **Diane Strollo & Jonathan Goldin:** Imaging Lung Disease in Systemic Sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* (2010) 12:156–161
- [106] **Behr J. and Furst D. E.:** Pulmonary function tests. *Rheumatology* 2008;47:v65–v67.
- [107] **Cutolo M. at all.:** La capillaroscopia ungueale nel monitoraggio del fenomeno di Raynaud e nella diagnosi precoce di della sclerosi sistemica. *Reumatismo* 2010;64(4):237-247

- [108] **Otylia Kowal Bielecka, Marek Bielecki, Krzysztof Kowal**: Recent advances in the diagnosis and treatment of systemic sclerosis. *Pol Arch Med Wewn.* 2013;123(1-2):51-8..
- [109] **Hachulla E, Launay D, Hatron PY**.:Iloprost for the treatment of systemic sclerosis. *Presse Med* 2008 May; 37: 831-9.
- [110] **Denton CP, Humbert M, Rubin L, Black Cm**: Bosentan treatment for pulmonary arterial hypertension related to connective tissue disease: a subgroup analysis of the pivotal clinical trials and their open-label extensions. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1336-40.
- [111] **Galiè N, Brundage Bh, Ghofrani Ha et al.**: Tadalafil Therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2009;119:2894903.
- [112] **P. Maddison**: Prevention of vascular damage in scleroderma with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition. *Rheumatology* 2002;41:965–971
- [113] **Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al., Scleroderma Lung Study Research Group**. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med.* 2006; 354: 2655-2666
- [114] **Tashkin DP, Roth MD, Clements PJ, Furst DE, Khanna D, Kleerup EC, Goldin J, at al. Scleroderma Lung Study II Investigators**. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomised controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir Med.* 2016 Sep;4(9):708-719. doi: 10.1016/S2213-2600(16)30152-7.
- [115] **Goldin JG, Kim GHJ, Tseng CH, Volkmann E, Furst D, Clements P, Brown M, et al.** Longitudinal Changes in Quantitative Interstitial Lung Disease on Computed Tomography after Immunosuppression in the Scleroderma Lung Study II. *Ann Am Thorac Soc.* 2018 Nov;15(11):1286-1295. doi: 10.1513/AnnalsATS.201802-079OC.
- [116] **Volkmann ER, Tashkin DP, Li N, Roth MD, Khanna D, Hoffmann-Vold AM, et al.** Mycophenolate Mofetil Versus Placebo for Systemic Sclerosis-Related Interstitial Lung Disease: An Analysis of Scleroderma Lung Studies I and II. *Arthritis Rheumatol.* 2017 Jul;69(7):1451-1460. doi: 10.1002/art.40114.
- [117] **Hasegawa M, Takehara K**: Potential immunologic targets for treating fibrosis in systemic sclerosis: a review focused on leukocytes and cytokines. *Semin Arthritis Rheum.* 2012 Dec;42(3):281-96.

- [118] **Fraticelli P, Gabrielli B, Pomponio G, et al:** Low-dose oral imatinib in the treatment of systemic sclerosis interstitial lung disease unresponsive to cyclophosphamide: a phase II pilot study. *Arthritis Res Ther.* 2014 Jul 8;16(4):R144
- [119] **Jordan S, Distler JH, Maurer B, et al;** EUSTAR Rituximab study group. Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group. *Ann Rheum Dis.* 2015 Jun;74(6):1188-94.
- [120] **Gilles Salles, John Francis Seymour, Fritz Offner, et al:** Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet*, Volume 377, Issue 9759, 1–7 January 2011.
- [121] **Smith V, Piette Y, van Praet JT, Decuman S, Deschepper E, et al:** Two-year results of an open pilot study of a 2- treatment course with rituximab in patients with early systemic sclerosis with diffuse skin involvement. *J Rheumatol.* 2013 Jan;40(1):52-7.
- [122] **Daoussis D, Tsamandas AC, Liossis SN, Antonopoulos I, et al.:** B-cell depletion therapy in patients with diffuse systemic sclerosis associates with a significant decrease in PDGFR expression and activation in spindle-like cells in the skin. *Arthritis Res Ther.* 2012 Jun 14;14(3).
- [123] **Warrens AN:** The evolving role of mycophenolate mofetil in renal transplantation. *QJM.* 2000 Jan;93(1):15-20.
- [124] **Daleboudt GM, Reinders ME, den Hartigh J, Huizinga TW, et al.:** Concentration-controlled treatment of lupus nephritis with mycophenolate mofetil. *Lupus.* 2013 Feb;22(2):171-9.
- [125] **Ginzler EM, Dooley MA, Aranow C, et al.** Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353(21):2219–2228.
- [126] **Matthew R. Smith, Sheldon C. Cooper:** Mycophenolate mofetil therapy in the management of inflammatory bowel disease — A retrospective case series and review. *Journal of Crohn's and Colitis* Volume 8, Issue 8, 1 August 2014.

- [127] **Dinesh Jothimani, Mathew E. Cramp, Tim J.S. Cross:** Role of Mycophenolate Mofetil for the Treatment of Autoimmune Hepatitis-An Observational Study. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 24 June 2014
- [128] **Mendoza FA, Nagle SJ, Lee JB, Jimenez SA:** A prospective observational study of mycophenolate mofetil treatment in progressive diffuse cutaneous systemic sclerosis of recent onset. *J Rheumatol.* 2012 Jun;39(6):1241-7.
- [129] **Fraticelli P, Fischetti C, Salaffi F, Carotti M, Mattioli M, Pomponio G, Gabrielli A** combination therapy with Rituximab and Mycophenolate Mofetil in Systemic Sclerosis. A single-centre case series study. *Clin Exp Rheumatol.* 2018 Jul-Aug;36 Suppl 113(4):142-145.
- [130] **Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, et al.** BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res* 2008; 68: 4774–4782.
- [131] **Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, et al. INPULSIS Trial Investigators.** Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014 May 29;370(22):2071-82. doi: 10.1056/NEJMoa1402584. Epub 2014 May 18. Erratum in: *N Engl J Med.* 2015 Aug 20;373(8):782.
- [132] **Distler O, Highland KB, Gahlemann M, Azuma A, Fischer A, Mayes MD, et al. SENSICIS Trial Investigators.** Nintedanib for Systemic Sclerosis- Associated Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med.* 2019 Jun 27;380(26):2518-2528. doi: 10.1056/NEJMoa1903076.
- [133] **Kuwana M, Azuma A. Nintedanib:** New indication for systemic sclerosis- associated interstitial lung disease. *Mod Rheumatol.* 2020 Mar;30(2):225-231. doi: 10.1080/14397595.2019.1696505.
- [134] **Wollin L, Distler JHW, Redente EF, Riches DWH, Stowasser S, Schlenker-Herceg R, Maher TM, Kolb M.** Potential of nintedanib in treatment of progressive fibrosing interstitial lung diseases. *Eur Respir J.* 2019 Sep 19;54(3):1900161. doi: 10.1183/13993003.00161-2019.
- [135] **Distler O, Gahlemann M, Maher TM.** Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. Reply. *N Engl J Med.* 2019 Oct 17;381(16):1596-1597. doi: 10.1056/NEJMc1910735.
- [136] **Moran-Mendoza O, Alharthi B, Clements-Baker M.** Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med.* 2019 Oct 17;381(16):1595. doi: 10.1056/NEJMc1910735.

[137] **Moroncini G, Grieco A, Nacci G, Paolini C, Tonnini C, et al** Epitope Specificity Determines Pathogenicity and Detectability of Anti-Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Autoantibodies in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Jul;67(7):1891-903.