

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

Dottorato di Ricerca in Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali

Indirizzo in Scienze Reumatologiche

Ciclo XXVII

**RELAZIONE TRA ALTERAZIONI  
GHIAIOLARI ECOGRAFICAMENTE  
RILEVABILI E RISCHIO  
CARDIOVASCOLARE IN PAZIENTI  
AFFETTI DA SINDROME DI SJÖGREN  
PRIMARIA**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

**Coordinatore d'Indirizzo:** Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Andrea Doria

**Dottorando:** Dr. Alberto Batticciotto

Indice .....	pag. 2
Riassunto.....	pag. 3
1. Introduzione .....	pag. 9
1.1 Eziopatogenesi	
1.2 Manifestazioni cliniche	
1.3 Diagnostica	
1.4 Sindrome di Sjögren e rischio cardio-vascolare	
1.5 Valutazione del rischio cardio-vascolare	
2. Obiettivi.....	pag. 32
3. Pazienti e Metodi.....	pag. 32
4. Risultati.....	pag. 40
5. Discussione .....	pag. 44
6. Conclusioni .....	pag. 47
Tabelle .....	pag. 49
Bibliografia .....	pag. 58

## **RIASSUNTO**

**Introduzione e scopo del lavoro.** Numerosi studi hanno osservato la presenza di elevata morbilità e mortalità cardiovascolare nei pazienti affetti da patologie autoimmuni sistemiche. Il riscontro di alterazioni cardiovascolari precoci sembra essere indipendente dai fattori di rischio tradizionali e probabilmente legato ad alterazioni connesse alla genesi infiammatoria di tali patologie.

La maggior parte dei lavori pubblicati in letteratura si riferiscono a pazienti con diagnosi di Artrite Reumatoide (AR) e Lupus Eritematoso Sistemico (LES), mentre sono attualmente molto limitati i dati per i soggetti affetti da Sindrome di Sjögren primaria (pSS).

Un recente studio epidemiologico su 312 pazienti con SS suggerisce di valutare attentamente il rischio cardiovascolare in quanto i soggetti inclusi nello studio manifestavano un'elevata incidenza di ipertensione arteriosa, diabete mellito e dislipidemia. Solo due studi, peraltro eseguiti su un limitato numero di pazienti e con risultati parzialmente contrastanti, dimostrano la presenza di una disfunzione endoteliale anche nei soggetti con pSS.

Attualmente la misurazione non-invasiva dello spessore medio-intimale (IMT) carotideo è considerato un marker clinico precoce di aterosclerosi, la stima della riserva di flusso coronarica (RFC) studiata mediante ecocardiografia transtoracica con stress farmacologico all'adenosina o al dipiridamolo è stata introdotta come marker diagnostico altamente sensibile di coronaropatia, mentre la valutazione sierica di dimetilarginina asimmetrica (ADMA), il principale inibitore endogeno della ossido-nitrico sintetasi, viene utilizzata come markers di funzionalità endoteliale e del microcircolo.

Alcuni lavori hanno, inoltre, dimostrato l'elevata sensibilità e specificità della valutazione ultrasonografica delle ghiandole salivari nella diagnostica della pSS ed il proposto score semiquantitativo 0-16 evidenzia una significativa correlazione sia con le alterazioni istologiche parenchimali sia con quelle funzionali.

Scopo primario dello studio è stato pertanto di valutare, in una coorte di pazienti affetti da pSS, i markers ecografici e biochimici di interessamento cardiovascolare

subclinico e di correlare tali dati con le alterazioni del parenchima ghiandolare ultrasonograficamente rilevabili.

**Materiali e Metodi.** Cinquantatre pazienti (7 maschi e 46 femmine, età media 59,8 anni ,con range 43-80 e durata media di malattia 59,5 mesi con range 6 – 156 mesi) noti per pregressa diagnosi di Sindrome di Sjögren primaria, secondo i criteri AECG, senza anamnesi e/o segni di malattia cardiovascolare in atto ed un gruppo omogeneo di controllo composto da 22 soggetti, senza storia né segni clinici di malattia cardiovascolare o autoimmune sistemica, sono stati inclusi nello studio.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad analisi ultrasonografica della carotide comune con ecografo My Lab 60 (Esaote, Florence, Italy) dotato di sonda-lineare di 2-9 MHz equipaggiato con software in radiofrequenza denominati RF-QIMT (Quality Intima Media Thickness) e RF-QAS (Quality Arterial Stiffness), sviluppati secondo le linee guida del Mannheim Consensus. Le immagini ecocardiografiche trans-toraciche e la valutazione del flusso di riserva coronarica sono state eseguite con ecografo IE33 (Philips Medical Systems, USA) dotato di sonde da 1-2 MHz e da 3-8 MHz, entrambe dotate di seconda armonica. Infine la valutazione ultrasonografica del parenchima ghiandolare è stata eseguita con ecografo My Lab 70 (Esaote, Florence, Italy) con sonda lineare 6-18 MHz.

I livelli sierici di VES, PCR, fattore reumatoide, ANA ed ENA sono stati valutati secondo le modalità routinarie mentre i livelli plasmatici di ADMA sono stati determinati usando cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

**Risultati.** Entrambi i gruppi si sono dimostrati omogenei per età ( $59,8 \pm 8,5$  Vs  $59,25 \pm 2,08$  anni  $p = 0,8$ ), sesso (46F 7M Vs 16F 6M  $p = 0,8$ ) e BMI ( $25,5 \pm 3,3$  Vs  $23,69 \pm 1,12$   $p = 0,17$ ), pressione arteriosa ( $126,66 \pm 13,4$  Vs  $125,61 \pm 12,48$   $p = 0,59$  ed  $79,4 \pm 4,6$  Vs  $80,45 \pm 8,25$   $p = 0,32$ ) mentre differiva per i valori medi di PCR ( $3,72 \pm 2,89$  Vs  $0,41 \pm 0,09$  mg/L  $p < 0,0001$ ), VES ( $30,25 \pm 20,2$  Vs  $4,8 \pm 0,24$   $p < 0,0001$ ) e colesterolo totale ( $182,77 \pm 7,12$  Vs  $163,33 \pm 5,59$   $p < 0,001$ ). Tutti i pazienti affetti da pSS mostravano una positività per gli ANA e l' 80,4% per gli ENA.

La valutazione cardiologica dei due gruppi ha evidenziato come i pazienti affetti da pSS presentassero valori di PWV medi e livelli sierici di ADMA statisticamente superiori a quelle dei controlli ( $9,2 \pm 1,8$  m/s Vs  $6,8 \pm 0,9$  m/s  $p < 0,0001$  e  $0,76 \pm 0,07$   $\mu$ M Vs  $0,54 \pm 0,05$   $\mu$ M  $p < 0,0001$ ). I valori medi di RFC osservati, seppur non patologici, si sono rivelati inferiori a quelli del gruppo di controllo ( $2,6 \pm 0,23$  Vs  $3,2 \pm 0,32$   $p < 0,0001$ ) ed infine, seppur senza differenze statisticamente significative nei valori medi di Q-IMT, l'88,7% (47/53 Vs 12/22  $p=0,001$ ) dei pazienti presentava valori medi superiori alla norma.

La valutazione ultrasonografica del parenchima ghiandolare, attraverso uno score validato, si è dimostrata statisticamente correlato con il BMI ( $p = 0,001$ ), i valori sierici di ANA ( $p < 0,0001$ ) e PCR ( $p = 0,034$ ) ma non con gli indici di danno cardiovascolare subclinico.

**Conclusioni.** Confrontando una coorte di pazienti affetti da pSS, senza storia clinica di accidenti cardiovascolari né anamnesi positiva per fattori di rischio cardiovascolari classici, con un gruppo di controllo omogeneo, si sono rilevate alterazioni statisticamente significative e suggestive per danno intimale pre-aterosclerotico e per una precoce disfunzione sia endoteliale sia dell'elasticità arteriosa.

La valutazione ultrasonografica del parenchima ghiandolare, secondo lo score validato in letteratura, quale surrogato sia del danno istologico infiammatorio cronico che di disfunzione ghiandolare, non correla con gli indici presi in considerazione per la valutazione del rischio cardiovascolare subclinico.

**Background:** Current thinking is that systemic inflammation, elevated levels of inflammatory cytokines, and immune dysregulation, typical of the inflammatory autoimmune disease, could play a role in accelerated atherosclerosis. Very limited data are present in literature up to now about sub-clinical cardiovascular involvement in Sjögren's syndrome. It was demonstrated that salivary glands ultrasound (US) score is strictly related to the histological inflammatory abnormalities.

**Objective.** We investigated sub-clinical cardiovascular involvement in primary Sjögren's syndrome (pSS) patients by means of ADMA, coronary flow reserve (CFR), intima-media thickness (cIMT) and pulse wave velocity (PWV). Furthermore, we performed salivary glands US in this pSS group and compared the validated US score with cardiovascular parameters.

**Methods.** Fifty-three consecutive outpatients with pSS (7 males, 46 females; mean age 59.8 range 43-80 years; mean disease duration of 59,5 range 6-156 months) without classical cardiovascular risk factors and overt cardiovascular disease, and 22 age- and gender-matched controls were enrolled. RF-QIMT and RF-QAS technologies were used for IMT and PWV evaluation and Dipyridamole transthoracic stress echocardiography assessed CFR. We also investigated plasma ADMA levels, inflammatory markers and autoantibodies. My Lab 70 (Esate, Florence, Italy) with linear probe (6-18 MHz) was used to assess salivary glands US according to the scoring system published by Salaffi et Al.

**Results.** Although within the normal range, CFR in pSS patients was lower than that of the controls ( $2,6 \pm 0,23$  Vs  $3,2 \pm 0,32$   $p < 0,0001$ ), whereas PWV and ADMA levels were significantly higher ( $9,2 \pm 1,8$  m/s Vs  $6,8 \pm 0,9$  m/s  $p < 0,0001$  and  $0,76 \pm 0,07$   $\mu\text{M}$  Vs  $0,54 \pm 0,05$   $\mu\text{M}$   $p < 0,0001$ ). Although QIMT values were not different in the two groups, the percentage of pSS patients with pathological values was higher ( $47/53$  Vs  $12/22$   $p = 0,001$ ).

Salivary glands US score was related to the BMI ( $p = 0,001$ ), CRP ( $p = 0,034$ ) and ANA ( $p < 0,0001$ ) plasma levels but not to the sub-clinical cardiovascular

involvement index evaluated in this study (PWV  $r = -0,205$   $p = 0,140$ , Q-IMT  $r = 0,261$   $p = 0,06$ , CRF  $r = -0,194$   $p = 0,249$ , ADMA  $r = 0,249$   $p = 0,075$ ).

**Conclusion.** Even if CFR values were normal, higher ADMA levels, PWV values and percentage of subjects with pathological Q-IMT with respect to an homogeneous control group suggest that pSS patients without classical cardiovascular risk factors have an early endothelial dysfunction and sub-clinical atherosclerosis.

Salivary US score is not related to the sub-clinical cardiovascular involvement parameters evaluated in this study.

# **1.INTRODUZIONE**

La Sindrome di Sjögren (SS) è una malattia autoimmune a decorso lentamente progressivo, caratterizzata da infiltrazione linfocitaria delle ghiandole esocrine. Le ghiandole più colpite sono le salivari e le lacrimali.

Descritta per la prima volta dall'oftalmologo svedese Henrik Sjögren agli inizi degli anni'30, ad oggi si stima una prevalenza media nella popolazione mondiale del 3% con una variabilità tra lo 0,1 e il 4,8% a seconda delle aree geografiche studiate e dei criteri diagnostici considerati. Può interessare uomini e donne (con un rapporto maschio-femmina di 1:9) di qualsiasi fascia di età con una frequenza maggiore tra la quarta e la quinta decade di vita. (1, 2)

Può manifestarsi come sindrome primaria (pSS) o in associazione con altre malattie autoimmuni sistemiche quali: l'artrite reumatoide (AR), il lupus eritematoso sistemico (LES), la sclerosi sistemica, la cirrosi biliare primitiva, la tiroidite di Hashimoto, la crioglobulinemia mista, la panarterite nodosa e le malattie infiammatorie intestinali.

## 1.1 EZIOPATOGENESI:

L'eziologia della pSS è, ad oggi, ancora non nota. Le teorie più accreditate parlano di molteplici fattori ambientali ed ormonali che, in un adeguato contesto genetico, fungono da fattori trigger per l'avvio della patologia autoimmune.

E' stata dimostrata l'associazione tra pSS ed alcuni antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) quali il DR3, DR5, DR6, DR8, B8, DRw52, HLADQA1\*0501, con alcuni polimorfismi genetici implicati nella genesi dell'interferone (IFN 5 e STAT4) e con alcuni polimorfismi genetici legati a fattori di regolazione delle risposte immuni quali FCGR3B e il CCL3L1. (2-8)

Tra i fattori ambientali gli agenti infettivi sono i maggiori indiziati nella genesi delle patologie autoimmuni. Frammenti di virus quali herpesvirus, cytomegalovirus ed Epstein-Barr Virus sono stati ripetutamente riscontrati a livello delle biopsie delle ghiandole salivari di pazienti affetti da pSS.

I coxsackievirus, data la loro capacità di persistere cronicamente all'interno dei linfociti B e delle cellule dendritiche potrebbero essere coinvolti nella stimolazione cronica policlonale che perpetua l'attacco autoimmune (9).

Altri virus potenzialmente interessati sono gli enterovirus, il virus dell'epatite C (HCV) ed alcuni retrovirus quali il Virus Linfotropico T umano e l'HIV. (10,11)

Un altro importante fattore ambientale trigger nello sviluppo della pSS sembra essere lo stress. Numerosi lavori hanno rilevato un elevato grado di stress psicologico o eventi negativi durante l'anno precedente l'esordio di malattia. (2-12)

La maggior prevalenza di pSS nelle pazienti di sesso femminile suggerisce un importante ruolo degli estrogeni. Studi su modelli animali hanno dimostrato che la mancanza di recettori estrogenici protegge dall'insorgenza della malattia e, viceversa, topi aromatasi-knockout hanno sviluppato più frequentemente un disordine linfoproliferativo molto simile alla pSS. (13-14)

Studi eseguiti su biopsie di ghiandole salivari minori hanno permesso di comprendere i meccanismi patogenetici alla base della pSS.

Le cellule epiteliali delle ghiandole esocrine ( ghiandole salivari, lacrimali, rene, fegato, pancreas, polmoni e tiroide) sono capaci di agire come “antigen presenting-cells” (APC) non professionali esprimendo sulla superficie molecole MHC di classe I e II e persino molecole costimolatorie caratteristiche che le rendono capaci di dare autonomamente il doppio segnale di attivazione ai linfociti T.

Inoltre, come vere e proprie APC, sono in grado di esprimere sulla loro superficie ICAM1 (intercellular adhesion molecule-1) e VCAM (vascular cell adhesion molecule) che favoriscono il richiamo e l’adesione all’endotelio vasale dei linfociti T attraverso il legame con le integrine LFA1 (leukocyte function-associated antigen-1) e VLA-4 (very late antigen-4). Infine, le cellule endoteliali delle ghiandole salivari esprimono sulla superficie CD40 capace di legarsi con il CD40L presente in grandi quantità sulla superficie dei linfociti T ed esprimono Toll Like Receptor funzionali capaci di riconoscere porzioni enzimatiche di agenti patogeni e di determinare, se attivati, la produzione di citochine pro-infiammatorie quali il TNFalpha, IL1 ed IL6 e l’aumento dell’espressione delle molecole co-stimolatorie e di adesione. (15)

Le stesse caratteristiche sono state riscontrate nelle cellule epiteliali tubulari renali di pazienti affetti da nefrite interstiziale; tale similitudine potrebbe spiegare alcune delle manifestazioni extraghiandolari della Sindrome di Sjögren.

Non è al momento evidente se l’attivazione delle cellule epiteliali sia determinato da un fenomeno estrinseco, quale ad esempio un agente patogeno, o da un innesco autoimmune intrinseco non ancora chiarito.

Alcuni autori ritengono che entrambi i meccanismi siano implicati, ipotizzando un innesco estrinseco in un contesto cellulare costitutivamente ricco di molecole di adesione e co-stimolatorie.

L’infiltrato linfocitario, composto prevalentemente da linfociti T attivati, le cellule epiteliali ed endoteliali coinvolte nei focolai precoci di malattia producono chemochine, quali ad esempio CXCL13, CXCL9, CXCL10 ed il fattore attivante le cellule B (BAFF) capaci di richiamare, attivare e stimolare i linfociti B. (16-18)

Le cellule B, cronicamente attivate, formano veri e propri centri germinativi all'interno della struttura parenchimale che sovvertono e progressivamente distruggono la fisiologica architettura ghiandolare. (19)

In conclusione, alla luce delle conoscenze attuali, la patogenesi della pSS può essere brevemente riassunta come un innesco esterno (infettivo, ormonale, psicologico, ecc.) che, in individui geneticamente predisposti, determina l'attivazione di cellule epiteliali ghiandolari che reclutano, attivano e stimolano l'espansione clonale di linfociti autoreattivi. Quest'ultimi, cronicamente stimolati, costituiscono centri germinativi che sovvertono e distruggono la fisiologica architettura ghiandolare.

## 1.2 MANIFESTAZIONI CLINICHE

Scolasticamente le manifestazioni cliniche della pSS vengono suddivise in ghiandolari ed extraghiandolari.

L'interessamento ghiandola principale determina la cosiddetta "sindrome secca" caratterizzata da xerostomia e xeroftalmia.

L'attacco autoimmune alle ghiandole lacrimali determina una riduzione della produzione della componente acquosa lacrimale, determinando una generica sensazione di corpo estraneo o "sabbia negli occhi", irritazione, prurito, bruciore oculare, accumuli di filamenti mucosi durante la notte e fotofobia. Nei casi più gravi si instaura un danno a carico dell'epitelio congiuntivale con conseguente comparsa di cheratocongiuntivite secca. (20)

Il coinvolgimento autoimmune delle ghiandole salivari determina una riduzione della produzione salivare che si manifesta con xerostomia, difficoltà a deglutire cibi solidi, incapacità di parlare in modo continuativo, cambiamenti nel senso del gusto, algie urenti a livello della mucosa orale, atrofia delle papille gustative, retrazione gengivale e difficoltà ad usare protesi dentarie.

La carenza salivare cronica aumenta la probabilità di sviluppare complicanze periodontali, carie ed eventi infettivi (infezione batterica del dotto di Stenone, candidosi).

La diminuzione del flusso salivare e la conseguente assenza dell'azione tampone sull'acido gastrico determina un incremento del reflusso acido laringo-tracheale che si manifesta con disfonia, tosse stizzosa, toracalgie e risvegli notturni.

Nel paziente anziano la xerostomia è spesso complicata da calo ponderale e nicturia.

Nel 30-50% dei pazienti si rileva l'incremento delle dimensioni delle ghiandole salivari con il riscontro episodico o cronico di tumefazione bilaterale dura e non dolente a livello ghiandola.

Nei pazienti affetti da pSS possono essere contemporaneamente interessate le ghiandole esocrine cutanee (secchezza cutanea), vaginali (xerosi vaginale, dispareunia e candidosi ricorrenti) e delle alte vie respiratorie (tosse secca e xerotrachea).

Le manifestazioni extraghiandolari più frequenti sono sintomi costituzionali sistemici quali astenia, febbricola ed artromialgie che colpiscono circa il 50% dei pazienti. L'astenia è spesso il sintomo principale all'esordio di malattia. (2)

La metà dei pazienti, inoltre, riferisce, una sintomatologia articolare che può manifestarsi sotto forma di artralgie, rigidità articolare mattutina, sinovite intermittente o poliartrite cronica non erosiva.

Il fenomeno di Raynaud si manifesta nel 35% dei casi senza causare ulcere o manifestazioni teleangectasiche periferiche.

A livello cutaneo è di frequente riscontro la secchezza mentre più rare sono manifestazioni quali l'eritema anulare, l'eritema pernio, la porpora piana (nei pazienti con marcata ipergammaglobulinemia) o la porpora palpabile di tipo vasculitico. (2)

L'interessamento dell'albero respiratorio induce tosse stizzosa secondaria a xerotrachea e/o fibrosi polmonare secondaria ad una interstiziopatia con prevalenza di cellule mononucleate peribronchiali. Seppur frequente, l'interessamento interstiziale è spesso subclinico e raramente rappresenta un problema rilevante per i pazienti. (21)

L'assenza dell'azione tamponante della saliva ed il possibile interessamento autoimmune delle ghiandole esocrine della mucosa gastrica determinano, frequentemente nei pazienti con pSS, disfagia, secchezza faringea, nausea ed epigastralgie.

Raramente si associano quadri clinici simili a cirrosi biliare primitiva di I stadio o ad epatiti autoimmuni. Nel 25% dei pazienti è riportato un interessamento pancreatico subclinico evidenziabile dalla presenza di modesta iperamilasemia.

L'interessamento renale tipico nelle prime fasi di malattia è la nefrite interstiziale mentre, specie nei pazienti con crioglobulinemia ed ipocomplementemia, si può tardivamente associare una glomerulonefrite membranosa o membranoproliferativa.

E' frequente l'interessamento del sistema nervoso centrale sotto forma di neuropatie distali simmetriche o di mononeuriti multiple o neuriti dei nervi cranici secondarie ad un processo vasculitico che coinvolge i vasa nervorum. Esso può manifestarsi sia in forma localizzata a livello cutaneo (vasculiti leucocitoclastiche) sia, sistemico, sotto forma di vasculite necrotizzante dei vasi di piccolo-medio calibro (a livello renale, gastrointestinale, polmoni e milza) associato a crioglobulinemia. (2)

La comorbidità tiroidea è assai frequente, visto che il 30-50% dei pazienti presenta un quadro sierologico compatibile con ipotiroidismo subclinico e positività autoanticorpale tiroide specifica; il 20% un vero e proprio ipotiroidismo e spesso è riscontrabile una franca tiroidite di Hashimoto in associazione.

I pazienti con pSS hanno un rischio di sviluppare malattie linfoproliferative maligne 44 volte superiore rispetto alla popolazione generale in particolare diversi sottotipi istologici di linfoma non-Hodgkin quali il linfoma follicolare, il linfoma linfoplasmocitico, linfoma diffuso a grandi cellule B ed il linfoma marginale extranodale. Quest'ultimo, il più frequente, interessa il tessuto linfoide associato alle mucose (MALT) solitamente delle ghiandole salivari maggiori ma anche dello stomaco, rinofaringe, cute, fegato, rene e polmone. Il MALToma può rimanere per anni localizzato e regredire spontaneamente oppure evolvere in un linfoma diffuso a grandi cellule B. Tale evoluzione deve essere sospettata in caso di comparsa di porpora palpabile, scomparsa della positività FR, di riscontro di bassi livelli sierici di C4 e di linfociti T CD4+ e di alti valori di  $\beta$ -2 microglobulina. (22)

Rare le associazioni con malattie quali la polimiosite e le mioisiti a corpi inclusi mentre, nel 20% dei casi di pSS, è possibile riscontrare un quadro caratteristico per sindrome Fibromialgica.

### 1.3 DIAGNOSTICA

Non vi sono parametri laboratoristici patognomonici per la pSS.

Tipico il riscontro di elevati valori sierici della velocità di eritrosedimentazione (VES) a fronte di valori di proteina C reattiva (PCR) nella norma e di una modesta anemia cronica.

Molteplici le positività autoanticorpali dei pazienti affetti da pSS quali gli anticorpi anti-nucleo, anti antigeni nucleari estraibili (in particolare SS-A ed SS-B), fattore reumatoide ed anticorpi organo-specifici ( anti-TPO, Anti-Tg, AMA, ASMA, APCA).  
(23)

Per la valutazione della secchezza oculare viene tipicamente utilizzato il Test di Schirmer. Semplici strisce di carta assorbente di 30 mm posizionate per 5 minuti all'interno delle palpebre inferiori e capaci di quantificare il volume di lacrime prodotte.

Meno utilizzati i test che attraverso Rosa Bengala o fluoresceina marcano le aree di epitelio congiuntivale danneggiate ed il Break-up time test che valuta l'alterazione del film lacrimale marcato con fluoresceina.

La valutazione dell'interessamento delle ghiandole salivari avviene attraverso metodiche quali la scialografia e la scintigrafia capaci di indagare la funzionalità ghiandolare e la risonanza magnetica nucleare e da alcuni anni l'ecografia ghiandolare che valutano le alterazioni morfologiche.

Standard di riferimento resta comunque la biopsia delle ghiandole salivari minori in cui è possibile evidenziare aggregati focali linfocitari, macrofagici e plasmacellulari o di veri e propri centri germinativi linfocitari che sostituiscono i normali acini ghiandolari.

Non esistono in letteratura criteri diagnostici per la pSS ma dal 1965 a oggi sono state pubblicate ben 11 proposte classificative. (24)

I più largamente utilizzati sono ancora oggi i criteri AECG pubblicati dopo una consensus Europea-Americana e revisionati nel 2002.

Con una sensibilità 97.2% e specificità 48.6% tali criteri classificano un paziente come affetto da pSS se esso soddisfa 4 o più dei seguenti criteri:

1. Sintomi oculari

(almeno una risposta positiva tra: sensazione di secchezza degli occhi da più di tre mesi, frequente sensazione di sabbia negli occhi, necessità di utilizzo di lacrime artificiali o colliri più di tre volte al giorno)

2 . Sintomi orali

(almeno una risposta positiva tra: sensazione di bocca secca da più di tre mesi? persistente ingrossamento delle ghiandole salivari, necessità di bere frequentemente o di non ingerire cibi solidi)

3. Segni oculari

(evidenza obiettiva di interessamento oculare data dalla presenza di almeno un segno positivo tra Schirmer test ( $\leq 5$  mm in 5 minuti), test rosa bengala o altri coloranti)

4. Istopatologia effettuata sulle ghiandole salivari minori

5. Segni di interessamento delle ghiandole salivari

(positività di uno tra i seguenti esami: scialometria, scialografia, scintigrafia salivare)

6. Autoanticorpi

( Presenza di uno o di entrambi gli anticorpi SS-A ed SS-B)

Sono considerati criteri di esclusione il trattamento radiante pregresso nella regione della testa e del collo, 'uso cronico di farmaci anti-colinergici, l'infezione da epatite C ed una precedente diagnosi di linfoma, sarcoidosi o malattia graft-versus-host. (25)

Una nuova classificazione è stata proposta nel 2012 dall' American College of Rheumatology composta di soli tre elementi oggettivi: cheratocongiuntivite secca con uno score di colorazione oculare  $\geq 3$ , biopsia delle ghiandole salivari labiali positiva e presenza di anticorpi anti-SSA e/o anti-SSB, oppure fattore reumatoide positivo e ANA con titolo  $\geq 1:320$ . Nel lavoro di validazione si è dimostrata elevata sensibilità e specificità (rispettivamente 93 e 95 %) e una buona concordanza con la precedente classificazione AECG. (26)

## 1.4 SINDROME DI SJÖGREN E RISCHIO CARDIO-VASCOLARE

La principale causa di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da malattie reumatiche infiammatorie croniche quali l'artrite reumatoide (AR), il lupus eritematoso sistemico (LES) e le vasculiti sistemiche è quella cardiovascolare (CV). (27)

Numerosi gli studi effettuati specificamente sull'argomento, come ad esempio lo studio condotto in Svezia tra il 1979 e il 1994, che ha coinvolto 606 pazienti affetti da AR (28), in cui il tasso di mortalità per eventi cardiovascolari, corretto per età, è risultato superiore del 50% nei pazienti affetti da AR, rispetto ai controlli o quello svolto in Gran Bretagna nel 2003 in cui pazienti affetti da AR mostravano una mortalità per infarto del miocardio 1,5 volte superiore ai soggetti non affetti da malattia in un follow up di 5 anni.

Ancora maggiore il rischio di sviluppare eventi cardiovascolari nei pazienti affetti da LES.

Uno studio ampio ma datato, condotto su 498 donne affette da LES, stratificate per età, ha mostrato un'incidenza di infarto del miocardio, nelle pazienti di età compresa tra i 35 ed i 44 anni, 52 volte maggiore rispetto a quella della popolazione generale. (29)

Fin dalla fine degli anni '90 fu chiaro come, l'aumento del rischio CV non fosse strettamente dipendente dai fattori di rischio tradizionali, quanto legato a fattori propri delle patologie infiammatorie autoimmuni.

Ad esempio un lavoro pubblicato nel 2001 su 296 pazienti con LES ha evidenziato un rischio relativo di coronaropatia, coronaropatia fatale ed infarto miocardico rispettivamente di 7,5 , 17 e 10,1 volte superiori rispetto le attese calcolate secondo i modelli dei tradizionali fattori di rischio secondo Framingham. (30)

I più recenti studi sulla patogenesi aterosclerotica riconoscono un ruolo attivo del sistema immunitario all'interno della placca stessa, secondario alla presenza di macrofagi e linfociti attivati.

Molteplici le citochine coinvolte, quali IL-1, TNF alpha, IFN gamma che agiscono sulle cellule endoteliali dei vasi riducendo le molecole anticoagulanti e aumentando le molecole di adesione leucocitaria (es. ICAM e VCAM), e le chemochine capaci di attirare macrofagi, linfociti B e T.

Particolare importanza rivestono i macrofagi che, nel tentativo di eliminare le lipoproteine a bassa densità ossidate che si localizzano a livello del sub-endotelio, si trasformano in cellule schiumose secernenti fattori di crescita e metallo proteasi che contribuiscono attivamente sia allo sviluppo della placca sia alla distruzione della tonaca media arteriosa.

L'attivazione dei macrofagi e dei linfociti T e l'aumento dei mediatori proinfiammatori sono eventi presenti sia nel processo aterosclerotico sia nelle malattie autoimmuni. (31)

Studi specifici, condotti in particolare sull'AR, attribuiscono agli elevati livelli plasmatici di citochine proinfiammatorie e all'aumentata prevalenza di alterazioni pro-aterogeniche (dislipidemia, insulinoresistenza, stato trombofilico e stress ossidativo) un ruolo fondamentale nello sviluppo di una disfunzione endoteliale che potrebbe spiegare l'accelerazione dei processi aterosclerotici in questa tipologia di pazienti. (32 -33)

A differenza dell'AR e del LES, pochi sono gli studi che si sono occupati del coinvolgimento cardiovascolare nella sindrome di Sjögren primitiva (pSS).

Nel 2010 uno studio su 312 pazienti affetti da pSS suggerisce di valutare attentamente il rischio cardiovascolare vista l'elevata incidenza di diabete mellito e dislipidemia. (33)

A simili conclusioni sono giunti anche i responsabili del registro inglese dei pazienti affetti da pSS che in una pubblicazione del Maggio 2014 sottolineano l'elevata incidenza di ipertensione arteriosa ed ipertrigliceridemia. (34)

All'edizione 2014 dell'annuale congresso europeo dei reumatologi, Antonio Avina-Zubieta e colleghi hanno presentato un lavoro retrospettivo su 1176 pazienti con diagnosi di pSS dimostrando un significativo incremento del rischio di infarto del miocardio, specie nel primo anno di malattia, ed un trend di incremento degli

eventi cerebro-vascolari rispetto ad un gruppo di controllo anche dopo correzione per i fattori di rischio cardiovascolari tradizionali.

Un lavoro su soli 17 pazienti affetti da pSS pubblicato nel 2010 ha evidenziato una diminuzione dell'attività sierica della "human serum paraoxonase 1" considerato un fattore di rischio cardiovascolare indipendente. (35)

Nel 2013 uno studio ecocardiografico su 50 pazienti turchi affetti da pSS ha evidenziato una disfunzione diastolica ventricolare correlata alla riduzione della rigidità della parete aortica mentre uno lavoro italiano pubblicato nel 2014 ha dimostrato come 34 pazienti affetti da pSS perdano nel tempo la capacità di riparazione endoteliale. (36,37)

Sono solo tre gli studi presenti in letteratura, peraltro con dati parzialmente contrastanti, che valutano specificamente la presenza di una disfunzione cardiovascolare preclinica nei pazienti con pSS.

Il primo, pubblicato nel 2005, ha evidenziato in 37 pazienti italiani affetti da pSS, uno spessore medio intimale superiore rispetto ai controlli sani con valori considerati patologici nel 49% dei soggetti indagati. Il secondo, pubblicato nel 2012, ha analizzato lo stesso parametro in 35 pazienti turchi affetti da pSS senza rilevare differenze statisticamente significative rispetto ad un gruppo di controllo sano. Nel 2014 uno studio ha rilevato una maggiore rigidità della parete arteriosa vascolare carotidea in 44 donne affette da pSS rispetto ad un gruppo di controllo eterogeneo. (38-40)

## **1.5 VALUTAZIONE DEL RISCHIO CARDIO-VASCOLARE:**

Molteplici le metodiche utilizzate in ambito cardiologico per valutare i diversi aspetti del danno aterosclerotico.

Le metodiche maggiormente utilizzate in letteratura vedono l'aumento della rigidità vascolare carotidea misurata tramite apposito software ecografico (PWV) e l'aumento dei valori sierici della dimetilarginina asimmetrica (ADMA) come indici precoci di disfunzione dell'endotelio vasale.

La valutazione ecografica carotidea della spessore medio intimale viene considerato indice di aterosclerosi conclamata mentre, lo studio del flusso di riserva coronarico tramite ecocolordoppler cardiaco con stress farmacologico, stima direttamente il benessere del microcircolo cardiaco.

### **ADMA E DISFUNZIONE ENDOTELIALE**

L'alterazione della funzione endoteliale viene considerata un marcatore precoce di aterosclerosi in quanto espressione di un fenomeno sistemico di alterata omeostasi vascolare. In particolare un importante ruolo è rivestito dalla ridotta biodisponibilità endoteliale di ossido nitrico (NO).

Il NO è una molecola gassosa, prodotta dalle cellule endoteliali, capace di inibire la funzione piastrinica locale, l'adesione dei monociti e dei linfociti in superficie e di diffondere verso le sottostanti cellule muscolari lisce inducendo vasodilatazione. Inoltre, è in grado di ridurre localmente la produzione vascolare dei radicali superossido e di inibire l'ossidazione delle LDL.(41,42)

Esistono tre isoforme di NOS (la forma endoteliale e-NOS, la forma neuronale e polmonare n-NOS e la forma macrofagica i-NOS), quella maggiormente presente nelle cellule endoteliali è la e-NOS, costitutivamente attiva, che converte l'amminoacido L-arginina in NO e citrullina.

Identificato nel 1992 nel plasma e nelle urine in associazione ad un altro analogo dell'arginina, la NG-monometil-Larginina (L-NMMA), l'ADMA è il più importante inibitore endogeno dell'ossido nitrico sintetasi (NOS), l'enzima coinvolto nella

sintesi del NO (43). Si ipotizza che esso stesso sia capace di attivare l'adesione leucocitaria e la produzione di citochine, inducendo una reazione infiammatoria vascolare (44).

Il ruolo dell'ADMA è stato studiato all'interno di patologie molto eterogenee, tra cui l'insufficienza renale, l'arteriopatia obliterante periferica, l'ipertensione essenziale, il diabete mellito di tipo I e II e altre malattie associate ad un aumentato rischio cardiovascolare (45).

E' stato dimostrato come i livelli di ADMA aumentino già in uno stadio preclinico della malattia vascolare, quando le lesioni aterosclerotiche non sono ancora visibili e che i valori sierici siano predittivi dell'outcome cardiovascolare nei pazienti già affetti da coronaropatia.

Gli studi sulla concentrazione plasmatica di ADMA nelle malattie reumatiche sistemiche sono stati effettuati principalmente sull' AR ed il LES, mentre nessuno studio è stato condotto sulla pSS.

Uno studio recente su pazienti affetti da AR all'esordio (46) ha proposto l'uso dell'ADMA come marker di disfunzione endoteliale precoce in questi pazienti. Surdacki et al. (47) hanno descritto l'associazione tra elevati livelli plasmatici di ADMA e aumentato IMT carotideo nei pazienti affetti da AR mentre Turiel et al. (48) hanno osservato una correlazione inversa tra ADMA e riserva di flusso coronarico nei pazienti con AR iniziale, ipotizzando un coinvolgimento cardiaco subclinico già presente in una fase precoce della malattia.

Nel LES, diversi studi hanno confermato la presenza di elevati livelli plasmatici di ADMA, frequentemente associati all'attività di malattia e alla presenza di danno d'organo (49). Si ipotizza inoltre che anche gli anticorpi anti-dsDNA (anti-double stranded DNA), presenti nel LES, possano contribuire all'aumento dei livelli di ADMA, causando un'up-regulation dell'enzima PRMT-1 (proteine arginina metiltransferasi tipo 1, coinvolto nella formazione di ADMA a partire dai residui di arginina).

Uno studio pilota condotto dal nostro gruppo, unico a nostra conoscenza mirato su pazienti affetti da pSS, ha evidenziato come in 22 soggetti con pregressa diagnosi

di pSS i valori sierici di ADMA fossero statisticamente superiori rispetto ad un gruppo di controllo.

### SPESSORE MEDIO-INTIMALE CAROTIDEO (cIMT)

L'IMT viene definito come la distanza tra l'interfaccia luminale e il confine tra media ed adventizia dell'arteria carotidea, valutata, tramite esame ultrasonografico, a livello della carotide comune.

Viene unanimemente considerato un indice tardivo di danno vascolare che riflette direttamente il processo aterosclerotico del soggetto con il limite di essere una pura valutazione anatomica probabilmente non capace di rispecchiare le alterazioni trombotiche ed infiammatorie a cui è legato l'evento cardiovascolare. (50)

Una metanalisi molto eterogenea pubblicata nel 2010 capace di valutare ben 60 studi caso controllo ( 25 su pazienti con AR, 24 con LES, 6 con sclerosi sistemica e 13 con altre malattie reumatiche) concludeva che lo spessore medio intinale nei pazienti con malattie reumatiche è aumentato rispetto ai controlli sani (51).

Una metanalisi pubblicata nel 2011 specificamente su 1384 pazienti affetti da AR dimostrava l'aumento di spessore dell' IMT significativo rispetto a 1147 controlli e nello stesso anno un piccolo lavoro su 75 pazienti affetti da AR senza fattori di rischio cardiovascolari classici mostravano valori superiori alla norma direttamente correlati con indici di attività di malattia quali indici di flogosi, erosioni e durata di malattia (52,53).

Limitati gli studi presenti in letteratura mirati sui pazienti affetti da pSS.

Il primo pubblicato nel 2005 evidenziava in un piccolo gruppo di pazienti italiano uno spessore medio intinale superiore rispetto ai controlli con valori considerati patologici nel 49% dei soggetti indagati. Mentre un secondo lavoro effettuato su 35 pazienti turchi affetti da pSS non ha evidenziato differenze statisticamente significative dello spessore intinale rispetto ad un gruppo di controllo sano (38,39).

I lavori scientifici eseguiti sono scarsamente confrontabili tra loro a causa delle numerose variabili interosservatore e della mancanza di standardizzazione della metodica. Per tale motivo, la metodica, seppur non invasiva e di semplice esecuzione, non viene largamente utilizzata (54,55).

Recentemente diverse case produttrici di macchine ultrasonografiche hanno sviluppato software capaci di valutare lo spessore intimale in modo automatico ed in un'area standardizzata, come ad esempio la metodica Q-IMT che grazie all'utilizzo di radio frequenze è in grado di valutare il diametro del vaso e lo spessore intimale in un modo completamente indipendente dall'operatore e dai settaggi della macchina utilizzati.

#### RIGIDITA' VASCOLARE: PULSE WAVE VELOCITY (PWV)

La riduzione della distensibilità arteriosa è un processo di invecchiamento vascolare e consiste nell'ispessimento e nella perdita di elasticità delle pareti arteriose. Molteplici le evidenze che suggeriscono come la rigidità vascolare arteriosa sia un marcatore precoce di vasculopatia, anche in assenza di franche lesioni arteriosclerotiche e un predittore indipendente di rischio cardiovascolare sia, in pazienti affetti da ipertensione arteriosa, diabete mellito, insufficienza renale cronica, sia nella popolazione generale anziana.

Scolasticamente l'albero vascolare può essere considerato come un insieme di tubi, dotati di proprietà elastiche e diverse resistenze, capaci di propagare l'onda pressoria anterograda generata dal cuore ma anche di stabilizzare le onde retrograde della fase diastolica.

Un sistema arterioso dotato di elevata distensibilità permette a tutti i tessuti dell'organismo di ricevere un adeguato e costante flusso sanguigno, senza l'esposizione dei tessuti ad aumentati picchi sistolici mentre la perdita di distensibilità permette alle onde retrograde di viaggiare più velocemente lungo l'albero arterioso ed in particolare rende l'aorta incapace di accogliere il volume di sangue espulso dal ventricolo sinistro, generando pressioni sistoliche maggiori. Inoltre nelle arterie sane dotate di una buona compliance le onde riflesse

raggiungono l'aorta ascendente in diastole, aumentandone così la pressione diastolica e il flusso coronarico, mentre nelle arterie rigide le onde ritornano più precocemente, ancora in fase sistolica, aumentando il polso sistolico, le pressioni di polso e il postcarico ventricolare (56-59).

Valutare la velocità di trasmissione dell'onda sfigmica in un determinato segmento arterioso ci permette di stimare indirettamente ed in modo non invasivo il grado di rigidità della parete arteriosa.

Varie le tipologie di misurazione proposte in letteratura negli ultimi anni come ad esempio la semplice valutazione della pressione arteriosa differenziale, l'ambulatory arterial stiffness index (derivato dalla relazione tra pressione arteriosa sistolica e diastolica durante un monitoraggio pressorio nelle 24 ore), l'augmentation aortica (ossia il contributo dell'onda riflessa alla pressione differenziale aortica), la morfologia dell'onda di polso, le metodiche ecografiche e di risonanza magnetica.

La metodica ultrasonografica, di recente sviluppo da parte di alcune case produttrici, prevede la valutazione della "Quality Arterial Stiffness" (QAS) che attraverso le radiofrequenze e un software dedicato è in grado di associare i parametri di distensione delle pareti dei vasi alla pressione sanguigna locale, determinando così i parametri di rigidità vascolare e la PWV in modo indipendente dall'operatore e dai settaggi utilizzati.

L'aumentata rigidità vascolare è stata associata a diverse condizioni morbose, come le malattie cardiovascolari (coronaropatia e scompenso cardiaco), obesità, fumo, ipertensione, ipercolesterolemia, alterata tolleranza al glucosio, iperomocisteinemia, elevati livelli di PCR e, altre patologie quali l'insufficienza renale, le vasculiti sistemiche, l'AR e il LES.

Uno studio pubblicato nel 2005 in cui sono stati valutati 101 pazienti affetti da LES ed 80 con AR, ha evidenziato un aumento della stiffness arteriosa rispetto al gruppo di controllo. Tali valori sembrano essere indipendente dalla presenza di aterosclerosi conclamata, ma correlati con la durata di malattia e con i valori di hsPCR. (60)

Un recente lavoro, mirato alla valutazione funzionale della parete arteriosa dei pazienti affetti da pSS, ha dimostrato come la combinazione di mediatori cronici dell' infiammazione e di fattori immunologici possano supportare la disfunzione precoce delle cellule endoteliali e muscolari lisce vasali (31).

Solo nell'Ottobre 2014, diversi mesi dopo l'inizio di questo studio, compare in letteratura il primo lavoro in cui venivano studiati specificamente pazienti con pSS. Rispetto al gruppo di controllo è stato rilevato un aumento della PWV media nelle 44 pazienti donne incluse. (40)

#### ECOCARDIOGRAFIA STANDARD E VALUTAZIONE DELLA RISERVA DI FLUSSO CORONARICO (RFC) TRAMITE ECOCARDIOGRAFIA CON STRESS FARMACOLOGICO

La stima della RFC studiata mediante ecocardiografia transtoracica con stress farmacologico all'adenosina o al dipiridamolo viene considerata un marker non invasivo ed altamente sensibile di coronaropatia (106,107).

Se associata alla valutazione della cinesi regionale del ventricolo sinistro attraverso la metodica ecocardiografica standard acquista anche un'elevata specificità (108).

Allo studio eco-PW-doppler, la velocità di flusso coronarico è bifasica, con un picco più basso durante la sistole e un picco più alto durante la diastole; la misurazione del picco di flusso diastolico dopo iniezione di un vasodilatatore (adenosina o dipiridamolo) rapportato al flusso diastolico basale rappresenta la RFC. Un valore di RFC <2 misurato a livello del tratto medio-distale dell'arteria coronaria discendente anteriore sinistra è in grado di predire accuratamente la presenza di una stenosi significativa (109) oppure in assenza di stenosi dei vasi epicardici, un valore ridotto di RFC può indicare un'alterazione del microcircolo coronarico così come dimostrato sia in pazienti con infarto miocardico ripperfuso, ipertensione arteriosa con o senza ipertrofia del ventricolo sinistro, diabete mellito, ipercolesterolemia, cardiomiopatia ipertrofica e collagenopatie.

Atzeni et Al. e Turiel et Al. hanno dimostrato rispettivamente nel 2007 e 2009 come in pazienti affetti da AR e persino in pazienti con AR all'esordio è osservabile una riduzione statisticamente significativa della RFC è stata osservata anche nei pazienti affetti da AR (61,62).

Nel 2012 uno studio su 40 pazienti ha dimostrato una riduzione della RFC anche in pazienti con pregressa diagnosi di LES rispetto ad un gruppo di controllo mentre non vi sono lavori specifici condotti su pazienti affetti da pSS.

#### UTILIZZO DELL'ULTRASONOGRAFIA PER LA VALUTAZIONE DEL PARENCHIMA DELLE GHIANDOLE SALIVARI.

Sempre più consistenti lavori hanno dimostrato l'elevata sensibilità e specificità della valutazione ultrasonografica delle ghiandole salivari nella diagnostica della pSS ed oggi, grazie alla sua ampia diffusione, non invasività, ottima accettabilità da parte del paziente e al basso costo, è la metodica più utilizzata.

Essa consente la valutazione morfologica delle ghiandole salivari maggiori (parotidi e sottomandibolari) con sonde a media – alta frequenza (7,5-13 MHz).

In condizioni fisiologiche la parotide appare con un' ecostruttura lobulare finemente disomogenea (molto simile a quella tiroidea) con una netta delimitazione capsulare ( il margine più profondo a volte non è visibile specie nei soggetti anziani) facilmente riconoscibile rispetto ai muscoli massetere, sternocleidomastoideo e digastrico che lo circondano.

Al suo interno è possibile identificare le stazioni linfonodali, il dotto di Stenone e in taluni casi il nervo facciale.

Le ghiandole sottomandibolari, poste al di sotto del corpo della mandibola tra il muscolo miloioideo, ipoglosso e stiloioideo, presentano le stesse caratteristiche ecostrutturali parotidiche ma non è possibile visualizzare ecograficamente il dotto di Wharton (64).

Le alterazioni ultrasonografiche tipiche delle ghiandole salivari dei pazienti affetti da pSS sono caratterizzate da aree di disomogeneità strutturale parenchimale con

aree ipoecogene, aree cistiche e/o calcificazioni. I margini appaiono irregolari o addirittura non visibili (specie quello più profondo), aumenta il numero di linfonodi peri o intraghiandolari, le dimensioni ghiandolari possono aumentare o diminuire (65).

La disomogeneità ecostrutturale è il parametro maggiormente significativo a livello diagnostico tanto che studi comparativi hanno indicato come le aree ipoecogene corrispondano all'esame RMN ad aree ipointense alternate a aree iperintense caratteristiche dei foci linfocitari e, all'esame istologico, a ectasie duttali circondate da denso infiltrato linfo-monocitario o a lobuli ghiandolari dilatati da aggregati linfo-monocitari.(66)

Molteplici le proposte di scoring semiquantitativo proposte in letteratura da utilizzare sia in fase diagnostica sia nel follow up dei pazienti affetti da pSS.

Lo "scoring system" maggiormente studiato ed utilizzato è quello proposto in uno lavoro multicentrico italiano del 2000 che prevede una valutazione da 0 a 4 per ciascuna ghiandola salivare maggiore in accordo con i seguenti parametri :

- Grado 0: ghiandola normale
- Grado 1: contorno regolare piccole aree/spot ipoecogeni senza bande iperecogene dimensioni della ghiandola conservate o aumentate (valori medi di  $20\pm 3$  mm per le parotidi e  $13\pm 2$  mm per le sottomandibolari) bordo ghiandolare posteriore definito rispetto alle strutture circostanti;
- Grado 2: contorno regolare, evidenti multiple aree ipoecogene distribuite non uniformemente di dimensioni variabili (<2 mm) in assenza di bande iperecogene, dimensioni ghiandolari conservate bordo ghiandolare posteriore mal definito rispetto alle strutture circostanti;
- Grado 3: contorno irregolare, evidenti aree ipoecogene diffuse o confluenti (2-6 mm) e/o multiple cisti in presenza di evidenti bande iperecogene, dimensioni ghiandolari conservate o ridotte, bordo ghiandolare posteriore non visibile;

- Grado 4: contorno irregolare, multiple aree ipoecogene (>6 mm), circoscritte o confluenti e/o multiple cisti, o multiple calcificazioni con marcate bande iperecogene e marcato sovvertimento strutturale, dimensioni ghiandolari ridotte, bordo ghiandolare posteriore non visibile.

Nel lavoro di validazione eseguito su 35 pazienti con diagnosi pregressa di pSS, confrontando tale score con uno semi-quantitativo istologico prodotto su esame bioptico delle ghiandole salivari minori dei pazienti affetti da pSS si è evidenziata una elevata accuratezza diagnostica e una sensibilità ad un valore cut off > 8 pari al 76,7 % con specificità dell' 83,3% (67).

Inoltre lo score ecografico totale correlava in modo statisticamente significativo sia con la percentuale volumetrica delle cellule infiammate sia con quella dei dotti salivari intralobulari (64). Tali dati sono stati confermati su 196 pazienti in un recente lavoro pubblicato su Lancet (64).

In un successivo lavoro eseguito da un gruppo di lavoro multicentrico italiano su 77 pazienti affetti da pSS lo score ultrasonografico 0-16 con un cut off > 6 ha evidenziato una sensibilità del 75.3% ed una specificità del 83.5% se paragonato con la scintigrafia o la scialometria con contrasto. (68)

Ancora in fase di studio l'utilità della metodica power Doppler nella diagnostica della pSS. Uno studio preliminare pubblicato già nel 2001 ha evidenziato alterazioni negli indici flussimetrici a livello dell'arteria carotide esterna e dell'arteria facciale, prima e dopo lo stimolo con succo di limone. (69)

Negli ultimi anni si sono moltiplicati i lavori che evidenziano l'utilità della diagnostica ecografica nella pSS ed alcuni lavori hanno dimostrato come essa migliori sensibilità e specificità sia dei criteri classificativi AECG sia di quelli ACR.

Un recente editoriale pubblicato online nell'Ottobre 2014 sottolinea però la necessità di una standardizzazione univoca della metodica prima del suo inserimento a titolo definitivo all'interno dei criteri classificativi (70).

## **2.OBIETTIVO**

L'elevata morbilità e mortalità cardiovascolare nei pazienti affetti da patologie autoimmuni sistemiche sono oramai note da anni; numerosi studi hanno evidenziato un interessamento cardio-vascolare precoce nei pazienti affetti da tali patologie, focalizzati in particolare nei soggetti con diagnosi di AR e LES. I dati attuali in letteratura riguardanti la Sindrome di Sjögren sono , al contrario, molto limitati.(27)

Recenti studi ultrasonografici effettuati sul parenchima ghiandolare hanno messo in evidenza come le alterazioni ecografiche patognomoniche della pSS correlino, sia con esami atti a valutare la funzionalità ghiandolare, come la scialografia e la scialoscintigrafia, sia con alterazioni istologiche rilevate alla biopsia.

Date tali premesse, scopo dello studio è stato quello di valutare, in una coorte di pazienti affetti da Sindrome di Sjögren primaria, markers ecografici e biochimici di interessamento cardiovascolare subclinico e di correlare tali dati con le alterazioni del parenchima ghiandolare ultrasonograficamente rilevabili.

### **3.MATERIALI E METODI**

Nel periodo tra Maggio 2012 e Dicembre 2014 sono stati consecutivamente arruolati, presso l' U.O.C. di Reumatologia dell'Ospedale Universitario L. Sacco, 53 pazienti noti per pregressa diagnosi di Sindrome di Sjögren primaria (7 maschi e 46 femmine, età media 59,8 anni ,con range 43-80 e durata media di malattia 59,5 mesi con range 6 – 156 mesi) secondo i criteri AECG, senza sintomi amanmestici e/o segni di malattia cardiovascolare in atto.

Un gruppo di controllo composto da 22 soggetti, omogeneo per caratteristiche demografiche ed antropometriche, senza storia clinica nè segni di malattia cardiovascolare o autoimmune sistemica, è stato estrapolato dal database storico dell'U.O. di cardiologia dell'Istituto Ortopedico Galeazzi.

Al fine di evitare elementi di confondimento secondari a noti fattori di rischio ateroslerotici, sono stati applicati i seguenti criteri di esclusione:

- pazienti affetti da ipertensione arteriosa (pressione arteriosa sistolica  $\geq$  140 mmHg, pressione arteriosa diastolica  $\geq$  90 mmHg o uso di terapia anti-ipertensiva);
  - pazienti noti per dislipidemia (livelli di colesterolo totale  $\geq$  200 mg/dL, colesterolo LDL  $\geq$  115 mg/dL, trigliceridi  $\geq$  150 mg/dL o uso di terapia ipo-lipemizzante);
- pazienti affetti da diabete mellito (diagnosticato attraverso i criteri WHO o uso di terapia antidiabetica);
- abitudine al fumo negli ultimi 10 anni;

- Body Mass Index (BMI) > 30.

Ulteriori criteri di esclusioni sono stati:

- presenza di una limitata finestra acustica, che rendeva tecnicamente difficoltoso lo studio ecocardiografico-Doppler bidimensionale (2-D) del ventricolo sinistro e del flusso arterioso della coronaria anteriore sinistra discendente (LAD), per la valutazione della RFC;
- presenza di cardiomiopatia ipertrofica, valvolare o congenita, miocarditi o pericarditi in atto;
- ritardo mentale;
- malattie linfoproliferative.

## VALUTAZIONE ECOCARDIOGRAFICA

Le immagini ecocardiografiche trans-toraciche sono state registrate usando l'ecografo IE33 (Philips Medical Systems, USA) dotato di sonda S1 da 1-2 MHz e di sonda S8 ad alte frequenze ed ampia banda di 3-8 mHz, entrambe dotate di seconda armonica. La valutazione cardiaca è stata eseguita attraverso approccio mono (M-mode) e bi-dimensionale (2D), come raccomandato dall'American Society of Echocardiography (70) e gli indici Doppler della funzione diastolica del ventricolo sinistro sono stati misurati usando tecniche standard (71). La valutazione della riserva di flusso coronarico (RFC) è stata effettuata valutando il flusso della coronaria anteriore sinistra discendente (LAD), mediante l'utilizzo del Doppler pulsato, prima e durante l'infusione di dipiridamolo (0,84 mg/kg in 6 minuti), usando una finestra ecocardiografica apicale due camere modificata. I soggetti in posizione supina, inclinati verso sinistra di 90° non avevano assunto cibi e /o bevande contenenti xantine metilate nelle 24 ore precedenti l'esecuzione dell'esame. Il valore di RFC è stato calcolato come il rapporto tra la velocità di picco diastolico durante la fase di iperemia e la velocità diastolica a riposo (per

ogni parametro, è stata calcolata la media dei risultati ottenuti da 3 cicli cardiaci). Un valore di RFC < 2,5 è stato considerato patologico. La valutazione è avvenuta monitorando costantemente i parametri elettrocardiografici dei soggetti e gli eventuali sintomi insorgenti. Alla fine del protocollo, a tutti i pazienti sono stati somministrati 125-250 mg di aminofillina, per contrastare l'effetto del dipiridamolo.

L'analisi dello spessore medio intimale e della rigidità arteriosa è stato eseguito a livello della carotide comune mediante valutazione ultrasonografica con l'ecografo My Lab 60 (Esaote, Florence, Italy), dotato di sonda-lineare di 2-9 MHz (modello LA532E) ed equipaggiato con moderni software di radiofrequenza denominati RF-QIMT (Quality Intima Media Thickness) e RF-QAS (Quality Arterial Stiffness), sviluppati secondo le linee guida del Mannheim Consensus (72). I pazienti sono stati esaminati in posizione supina con il collo esteso e il mento girato controlateralmente. Il trasduttore ed il fascio ultrasonografico sono posizionati a circa 90° rispetto all'asse maggiore della carotide comune, sulla base dell'immagine B dimensionale, e la valutazione automatica viene eseguita a 3 cm dalla biforcazione carotidea.

Il software dedicato alla RF-QAS acquisisce direttamente sei cicli di misure in successione, le rispettive deviazioni standard e le medie delle misurazioni. Per ciascuna carotide (destra e sinistra) sono state acquisite almeno 3 immagini, così da ottenere almeno due dati completi per ciascun paziente. Le variazioni del diametro dell'arteria tra la fase sistolica e diastolica permettono alla macchina di determinare il coefficiente di distensibilità, il coefficiente di compliance, la rigidità alfa, la rigidità beta e la pulse wave velocity locale.

Lo strumento dedicato alla misurazione dell'RF-QIMT, dopo posizionamento manuale del cursore da parte dell'operatore, identifica automaticamente il bordo endoteliale ed acquisisce 3 serie di misurazioni per ciascuna carotide, dopo aver ottenuto una deviazione standard <0.05 per la media dei valori rilevati.

#### VALUTAZIONE ECOGRAFICA DELLE GHIANDOLE SALIVARI

La valutazione ultrasonografica del parenchima delle ghiandole salivari maggiori è stato eseguito con ecografo My Lab 70 (Esaote, Florence, Italy) equipaggiato con

sonda lineare 4 -18 MHz secondo linee guida e score sistem pubblicato da Salaffi et Al. nel 2000 (67).

#### VALUTAZIONE LABORATORISTICA

I livelli plasmatici di ADMA sono stati determinati usando cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC, high performance liquid chromatography) secondo linee guida e come descritto da Teerlink et al. (73) nel 2005. Il limite di rilevazione della metodica è di 0,01  $\mu\text{m}$  mentre vengono considerati nella norma valori compresi tra 0.1 e 20  $\mu\text{m}$ .

I valori sierici di anticorpi anti-nucleo sono stati determinati con la tecnica di immunofluorescenza indiretta su cellule Hep-2 , mentre la presenza di anticorpi diretti contro antigeni nucleari estraibili (ENA), inclusi SSA e SSB, sono stati dosati con metodiche ELISA. Il fattore reumatoide è stato misurato tramite immunonefelometria con il sistema quantitativo N Latex RF (Dade Behring, Marburg, Germania) mentre la valutazione di IgG dirette contro peptidi ciclici citrullinati tramite metodica ECLIA (immunoassay in elettro-chemi-luminescenza). I livelli sierici degli indici di flogosi : VES e PCR sono stati misurati con i metodi di routine .

#### VALUTAZIONE STATISTICA

La valutazione statistica è stata effettuata con il software SPSS V17.0 (SPSS Inc, Chicago Illinois). Le differenze fra i gruppi di pazienti sono state analizzate con statistiche parametriche (ANOVA) per le variabili con distribuzione normale e, con test non parametrici (Mann-Whitney) per le altre variabili. Per l'analisi delle correlazioni è stata utilizzata la correlazione non parametrica di Spearman. Per l'individuazione delle variabili predittive sulla positività degli score ecografici è stato utilizzato un modello di regressione binaria, con backward selection delle variabili secondo la statistica di Wald.

#### COMITATO ETICO

Il protocollo di studio è stato approvato dalla commissione etica locale e il consenso informato per l'esecuzione delle procedure è stato ottenuto da tutti i

partecipanti allo studio ( solo 37 pazienti hanno accettato di essere sottoposti ad ecocolordoppler cardiaco con stress farmacologico).

Questo studio è stato condotto in accordo alle linee guida etiche della Dichiarazione di Helsinki del 1975.

## **4.RISULTATI**

Cinquantatré pazienti, con diagnosi di Sindrome di Sjögren primaria secondo i criteri AECG, sono stati consecutivamente arruolati nello studio secondo i criteri di inclusione già menzionati. Sette maschi e 46 femmine con età media di 59,8 anni (range 43-80), body mass index medio di  $25,5 \pm 3,3$  (durata media di malattia di 59,5 mesi (range 6 – 156)).

L'84,3% dei pazienti lamentava xerostomia e xeroftalmia, il 47% riferiva almeno un episodio artro-sinovitico, il 24,5% una complicanza vasculitica ed il 15,1% un interessamento polmonare di tipo interstiziopatico; infine il 33,9% lamentava una sintomatologia compatibile con fenomeno di Raynaud secondario ed il 37,2% presentava in anamnesi comorbidità per una patologia autoimmune tiroidea.

Dal punto di vista laboratoristico i pazienti presentavano un valore medio di proteina C reattiva pari a  $3,72 \pm 2,89$  mg/l (v.n. < 5) e di velocità di eritrosedimentazione di  $30,25 \pm 20,2$  (v.n. < 20). Tutti i pazienti erano ANA positivi, l'80,4% ENA positivi (80,4% SS-A e 50,1% SS-B positivi), il 60,8% FR positivo ed il 17,6% ANTI-CCP positivo.

L'82,2% dei pazienti era in trattamento con idrossiclorochina, 8,2% con methotrexate e l'8,2% con azatioprina. Il 19,6% dei soggetti era, al momento della valutazione, in trattamento con corticosteroidi (media di equivalente prednisonico di 4,2mg/die range 2,5-5mg) ed il 29,4% aveva utilizzato steroidi almeno una volta in passato (il 71% di questi pazienti presentava un interessamento articolare della patologia).

Il gruppo di controllo composto da 22 soggetti sani (16 donne e 6 maschi) con età media di 59,25 anni (range 54-61) e BMI medio di  $23,69 \pm 1,12$  si è dimostrato omogeneo con il gruppo dei pazienti affetti da pSS per età ( $59,8 \pm 8,5$  Vs  $59,25 \pm 2,08$  anni  $p = 0,8$ ), sesso ( $p = 0,8$ ), BMI ( $25,5 \pm 3,3$  Vs  $23,69 \pm 1,12$   $p=0,17$ ), pressione arteriosa ( $126,66 \pm 13,4$  Vs  $125,61 \pm 12,48$   $p= 0,59$  ed  $79,4 \pm 4,6$  Vs  $80,45 \pm 8,25$   $p= 0,32$ ) mentre differiva per i valori medi di PCR ( $3,72 \pm 2,89$  Vs  $0,41 \pm 0,09$  mg/L  $p<0,0001$ ), di VES ( $30,25 \pm 20,2$  Vs  $4,8 \pm 0,24$   $p < 0,0001$ ) e di colesterolo totale ( $182,77 \pm 7,12$  Vs  $163,33 \pm 5,59$  mg/dl  $< 0,001$ ). (Tabella I)

La valutazione cardiologica dei due gruppi ha evidenziato come, tra i pazienti affetti da pSS, il 17% presentasse valori di rigidità carotidea superiori alla norma con una PWV media di  $9,2 \pm 1,8$  m/s ed una differenza media statisticamente significativa rispetto al gruppo di controllo ( $6,8 \pm 0,9$  m/s  $p < 0,0001$ )

Sebbene, l'88,7% (47/53) dei pazienti presentasse valori di spessore mio-intimale superiore alla norma, in almeno una carotide, in modo statisticamente diverso rispetto al gruppo di controllo (54% 12/22  $p=0,001$ ), la media di tali valori, non si discostava in modo statisticamente significativo da quella dei soggetti sani ( $0,6 \pm 0,1$  mm Vs  $0,5 \pm 0,1$  mm  $p= 0,069$ )

Nessuno dei soggetti esaminati evidenziava una riserva di flusso coronarico inferiore alla norma (il 27% dei pazienti presentava valori borderline); i valori medi osservati si sono rivelati superiori a quelli del gruppo di controllo ( $2,6 \pm 0,23$  Vs  $3,2 \pm 0,32$   $p < 0,0001$ ).

Infine, anche i valori sierici di ADMA si sono rivelati statisticamente più elevati nel gruppo di pazienti affetti da pSS rispetto al gruppo di controllo ( $0,76 \pm 0,07$   $\mu$ M Vs  $0,54 \pm 0,05$   $\mu$ M  $p < 0,0001$ ) ( Tabella II) ( Figura 1,2,3,4).

La regressione lineare utilizzata per valutare l'eventuale correlazione tra indici cardiologici e le caratteristiche della nostra coorte di pazienti (Tabella III) ha evidenziato come la PWV correli con il BMI ( $p=0,005$ ) e per valori borderline con l'età dei pazienti ( $p= 0,056$ ). Lo spessore medio intimale correla con il BMI ( $p=0,008$ ), i valori sierici di ANA ( $p=0,001$ ) e le complicanze vasculitiche ( $p=0,003$ ) mentre i valori di riserva di flusso coronarico correlano con l'età ( $p < 0,0001$ ), la comorbilità vasculitica ( $p= 0,045$ ) ed i valori sierici di PCR ( $p= 0,001$ ), ANA ( $p < 0,0001$ ) ed ENA ( $p < 0,0001$ ). I valori sierici di ADMA non sembrano correlare con alcuno dei parametri valutati.

L'utilizzo della terapia steroidea, sia pregressa che in atto, è inoltre correlato ad aumentati valori di Q-IMT ( $p < 0,0001$ ) e CRF ( $p=0,029$ ).

La valutazione ultrasonografica del parenchima ghiandolare dei pazienti con pSS, secondo lo score validato, ha evidenziato valori medi di 9,98 con range compreso tra 3 e 16. Tutti i soggetti mostravano almeno una ghiandola con score  $>2$  ed il

75,5% (40/53) dei soggetti esaminati presentava uno score totale patologico. (Figure 5,6,7,8,9)

Le ghiandole sottomandibolari mostravano un danno, ultrasonograficamente rilevabile, statisticamente superiore rispetto alle parotidi ( $p= 0,001$ ) ( Figura 10).

La regressione lineare, con cui abbiamo analizzato i dati raccolti, ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa tra lo score ghiandolare e il BMI dei pazienti ( $p= 0,001$ ) e con i valori sierici di ANA ( $p< 0,0001$ ) e PCR ( $p= 0,034$ ). Non è stata invece evidenziata correlazione con l'età dei pazienti ( $p= 0,548$ ) e l'anzianità di malattia ( $p= 0,213$ ) (Tabella IV)

Tutti gli score sono stati correlati con i parametri cardiologici precedentemente discussi. (Tabella V)

Utilizzando il test di Spearman non si sono evidenziate correlazioni tra lo score ghiandolare ed i valori di ADMA ( $r= 0,249$   $p= 0,075$ ), RFC ( $r= -0,194$   $p= 0,249$ ), rigidità della parete carotidea ( $r= -0,205$   $p= 0,140$ ) e con lo spessore medio-intimale ( $r= 0,261$   $p< 0,06$ ).

## **5.DISCUSSIONE**

L'elevata morbilità e mortalità cardiovascolare nei pazienti affetti da patologie autoimmuni sistemiche sono note da alcuni decenni. Numerosi gli studi riguardanti il coinvolgimento cardiovascolare subclinico nei pazienti affetti da AR e LES ma limitati i dati presenti in letteratura per i soggetti affetti da pSS (27).

Nella nostra corte di pazienti, i valori sierici di ADMA, marcatore precoce di disfunzione endoteliale e di aterosclerosi subclinica (45), si sono rivelati superiori rispetto a quelli del gruppo di controllo. Le principali cause note per l'incremento sierico di ADMA, quali diabete mellito e dislipidemia (43), erano state considerate criteri di esclusione per la partecipazione allo studio, pertanto possiamo ipotizzare che, l'essere affetti da pSS sia di per sé un fattore indipendente per lo sviluppo di disfunzione endoteliale precoce. Da sottolineare come l'utilizzo di basse dosi di equivalente prednisonico da parte di 10 dei 53 soggetti, non è significativamente correlato, nella nostra casistica, con i valori sierici di ADMA.

Inoltre, i valori medi di PWV di entrambe le carotidi, seppur nell'83% dei casi entro i valori di norma, erano significativamente maggiori rispetto quelli del gruppo di controllo. Tali dati sembrano rafforzare le conclusioni di Gerli E. et Al. (74) che nel 2012 avevano dimostrato l'alterazione funzionale precoce della parete arteriosa dei pazienti affetti da pSS e sono in linea con i dati pubblicati nell'Ottobre 2014 da Sabio JM. et Al. (40) che, in un gruppo di 44 pazienti spagnoli affetti da pSS, avevano rilevato valori di PWV statisticamente superiori ai controlli.

La valutazione del Q-IMT (noto indice di aterosclerosi subclinica), nella nostra corte di pazienti, seppur non abbia evidenziato valori medi statisticamente superiori a quelli del gruppo di controllo ( forse a causa della bassa numerosità del campione) ha rilevato valori patologici in almeno una carotide, nell'88,7% dei pazienti.

Da sottolineare che valori di RFC, predittori come dimostrato ampiamente in letteratura, di severa stenosi coronarica e marcatori diagnostici altamente sensibili di malattia cardiovascolare, seppur con valori medi statisticamente superiori a quelli del gruppo di controllo, si sono mantenuti al di sopra dei valori considerati patologici nella totalità dei pazienti.

Per la prima volta, a nostra conoscenza, abbiamo correlato indici di interessamento subclinico cardiovascolare con le alterazioni ecografiche del parenchima ghiandolare salivare, surrogato sia del danno istologico infiammatorio cronico (67), sia della disfunzione ghiandolare (68), rilevando una correlazione statisticamente significativa solo con i valori di Q-IMT.

Il limite principale dello studio è dato dalla bassa numerosità dei soggetti studiati, anche se superiore a quelle di tutti gli studi pubblicati attualmente in letteratura.

## **6.CONCLUSIONI**

In una coorte di pazienti affetti da pSS, senza storia clinica di accidenti cardiovascolari né anamnesi positiva per i fattori di rischio cardiovascolari classici, utilizzando indicatori ecocardiografici e sierologici, noti in letteratura, per la valutazione del rischio subclinico cardiovascolare (ADMA, PWV, Q-IMT, CRF), si sono evidenziate alterazioni statisticamente significative, rispetto ad un gruppo di controllo omogeneo, suggestive per una precoce disfunzione endoteliale, una precoce perdita di elasticità arteriosa e danno intimale pre-aterosclerotico.

La valutazione ultrasonografica del parenchima ghiandolare, secondo lo score validato in letteratura, quale surrogato sia del danno istologico infiammatorio cronico che di disfunzione ghiandolare, non correla con gli indici presi in considerazione per la valutazione del rischio cardiovascolare subclinico.

Saranno tuttavia necessari ulteriori studi su un numero più elevato di pazienti ed un lungo follow-up per comprendere il reale valore predittivo di tali valutazioni.

## TABELLE

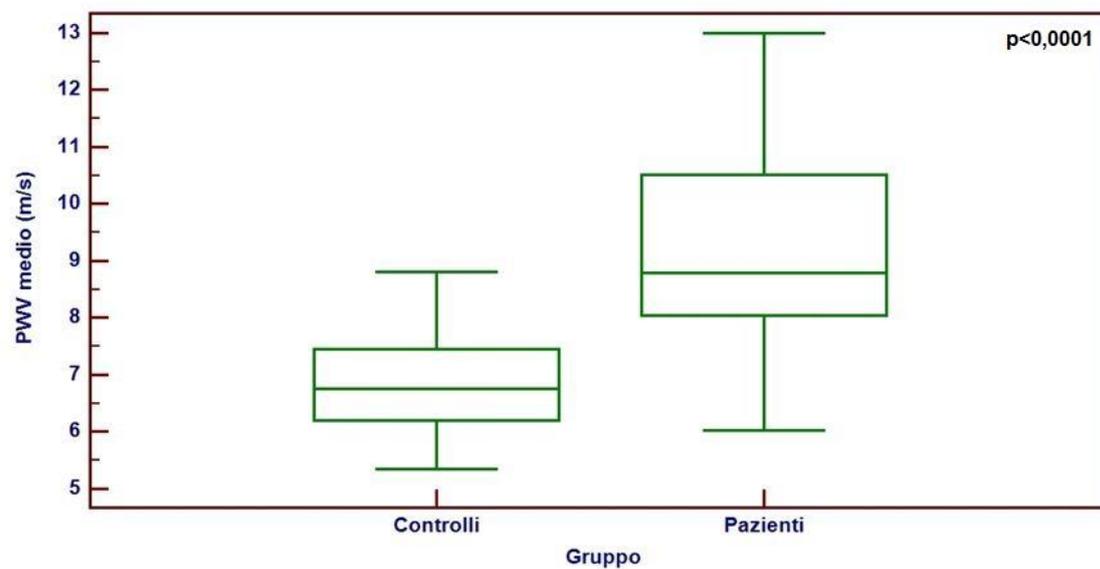
**TABELLA I. Caratteristiche demografiche e laboratoristiche dei soggetti ammessi allo studio.**

	<b>PAZIENTI (53)</b>	<b>CONTROLLI (22)</b>	<b>P</b>
<b>SESSO</b>	7 M 46 D	6 M 16 D	0,14
<b>ETA' (anni)</b>	59,8 ± 8,5	59,25 ± 2.08	0,80
<b>BMI</b>	25,5 ± 3,3	23,69 ± 1.12	0,17
<b>VES (mm/h)</b>	30,25 ± 20,2	4,8 ± 0.24	< 0,001
<b>PCR (mg/L)</b>	3,72 ± 2,89	4,1 ± 0,9	0,59
<b>PAAs (mmHg)</b>	126,66 ± 13,4	125,61 ± 12,48	0,59
<b>Pad (mmHg)</b>	79,4 ± 4,6	80,45 ± 8,25	0,32
<b>Colesterolo TOT</b>	182,77 ± 7,12	163,33 ± 5,59	< 0,001
<b>DURATA DI MALATTIA (mesi)</b>	59,5	-	

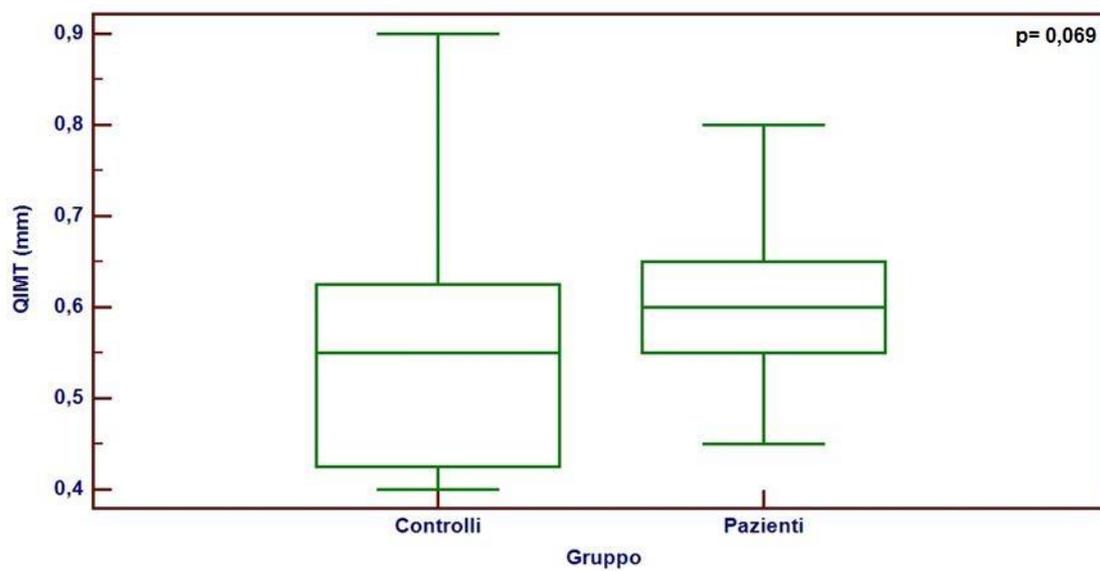
**TABELLA II. Valutazione cardiologica**

	<b>PAZIENTI</b> (media ± DS)	<b>CONTROLLI</b> (media ± DS)	<b>P</b>
<b>PWV (m/s)</b>	9,2 ± 1,8	6,8 ± 0,9	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Q-IMT (mm)</b>	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,069
<b>CRF</b>	2,6 ± 0,23	3,2 ± 0,32	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>ADMA (µM)</b>	0,76 ± 0,07	0,54 ± 0,05	<b>&lt; 0,0001</b>

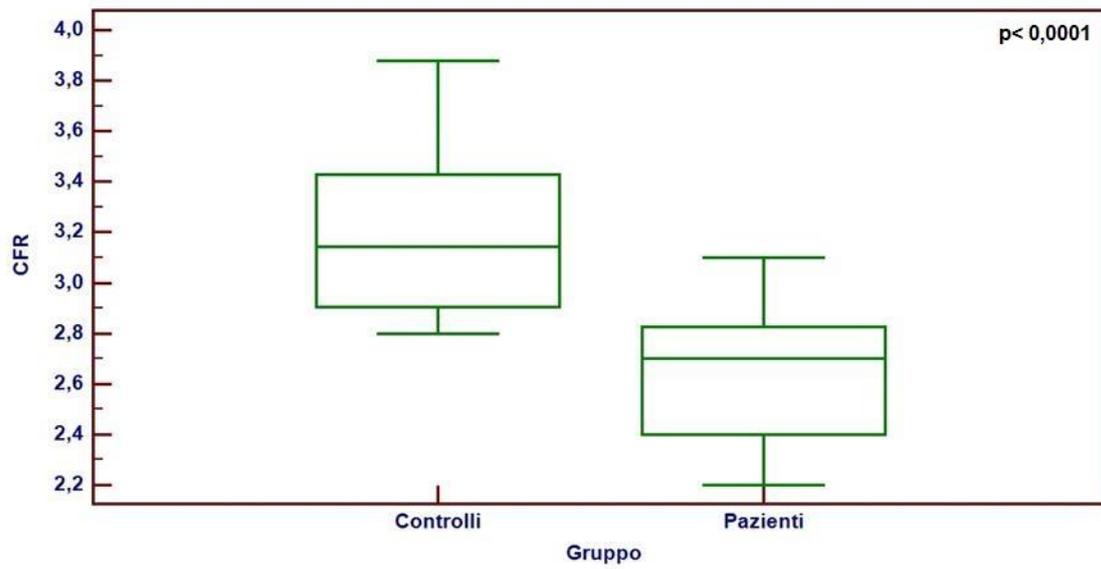
**FIGURA 1. Pulse Wave Velocity**



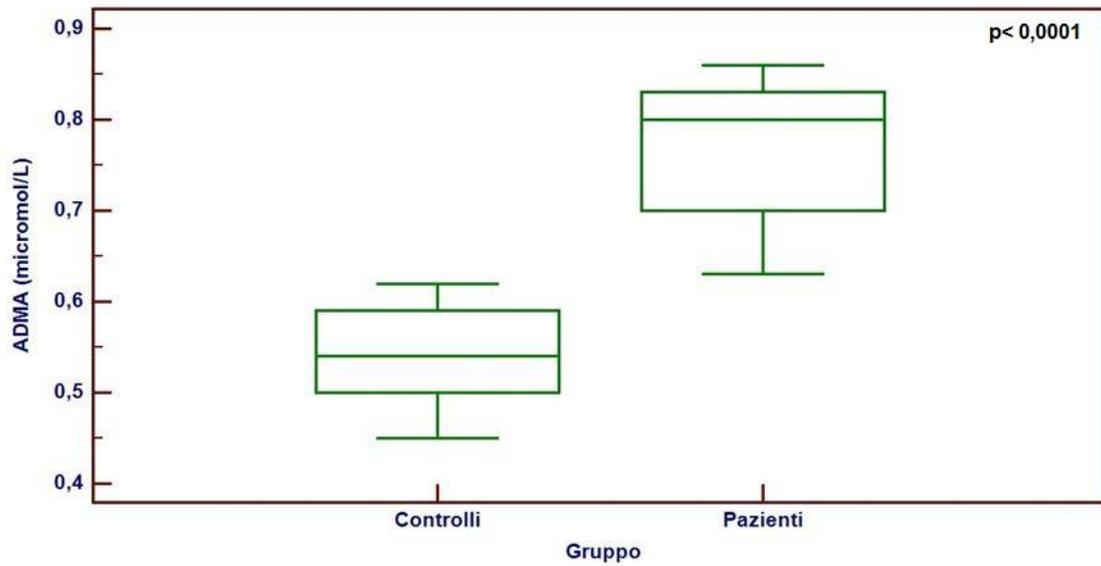
**FIGURA 2. Q- Intima Media Thickness**



**FIGURA 3. Flusso di riserva coronarica**



**FIGURA 4. ADMA**



**TABELLA III. ANOVA tra indici cardiologici e caratteristiche dei pazienti**

	<b>PWV (p)</b>	<b>Q-IMT (p)</b>	<b>CRF (p)</b>	<b>ADMA (p)</b>
<b>ETA' (anni)</b>	<b>0,056</b>	0,089	<b>&lt; 0,0001</b>	0,138
<b>Durata di malattia (anni)</b>	0,409	0,709	0,560	0,134
<b>BMI</b>	<b>0,005</b>	<b>0,008</b>	0,467	0,333
<b>PCR</b>	0,368	0,135	<b>0,001</b>	0,882
<b>VES</b>	0,013	0,203	<b>0,036</b>	0,348
<b>ENA</b>	0,206	0,780	<b>&lt; 0,0001</b>	0,824
<b>ANA</b>	0,716	<b>0,001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	0,108
<b>F. di Raynaud</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	0,166	0,072	0,448
<b>Vasculite</b>	0,624	<b>0,003</b>	<b>0,045</b>	0,066
<b>UTILIZZO STEROIDE (passato)</b>	0,315	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,029</b>	0,470
<b>UTILIZZO STEROIDE (attivo)</b>	0,774	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,029</b>	0,169

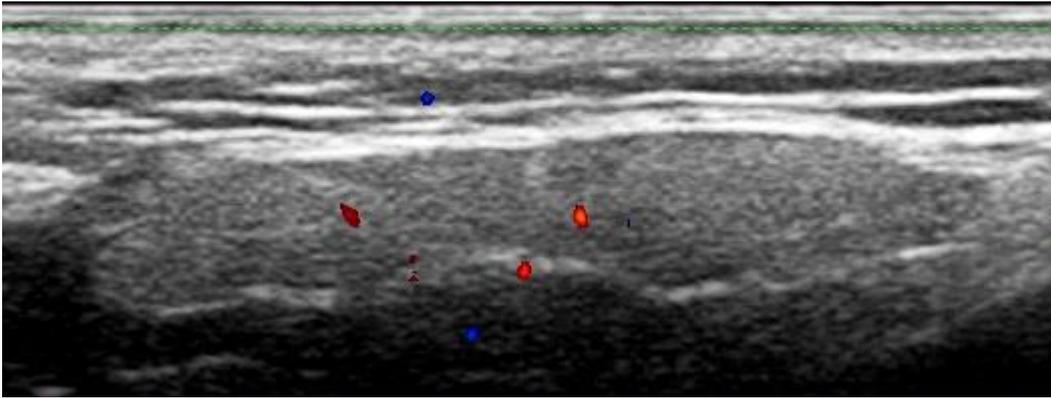


Figura 5. Parotide: quadro di normalità ecografica

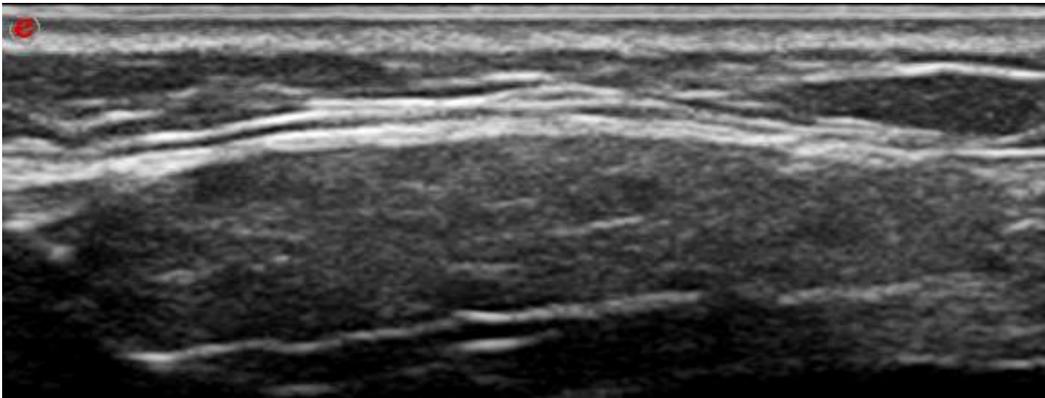


Figura 6. Sottomandibolare: contorno regolare, piccole aree ipoecogene, dimensioni della ghiandola conservate, bordo ghiandolare posteriore definito. Grado 1.

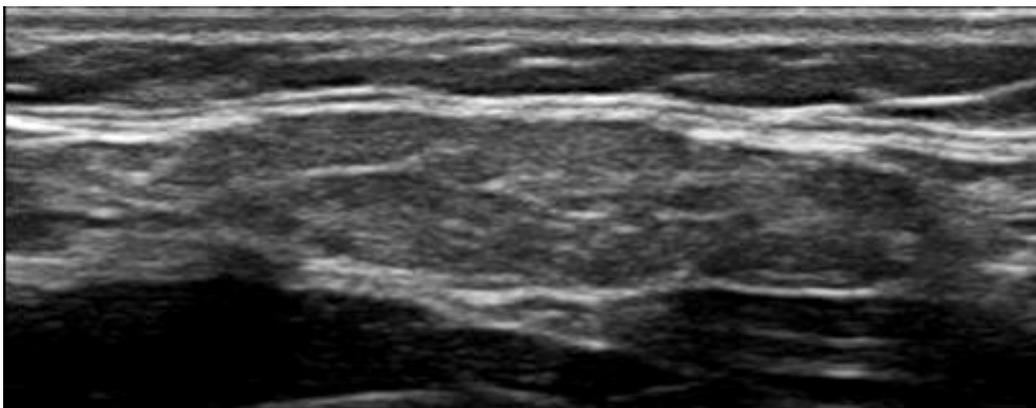


Figura 7. Sottomandibolare: contorno regolare, multiple aree ipoecogene distribuite non uniformemente, dimensioni ghiandolari conservate. Grado 2.

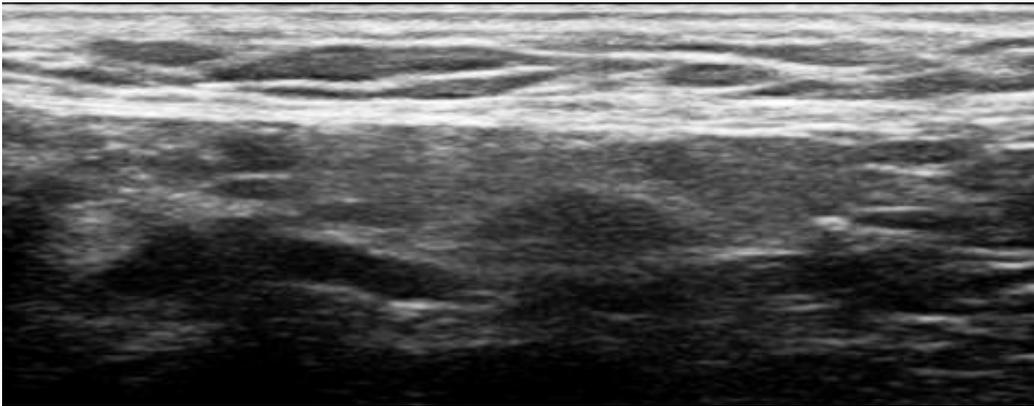


Figura 8. Sottomandibolare: contorno irregolare, evidenti aree ipoecogene diffuse e confluenti, piccole bande iperecogene, dimensioni ghiandolari conservate, bordo ghiandolare parzialmente non visibile. Grado 3.

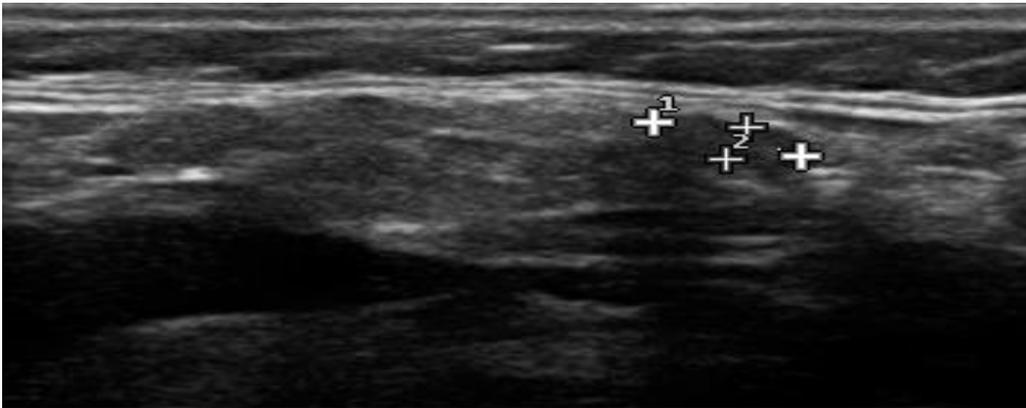
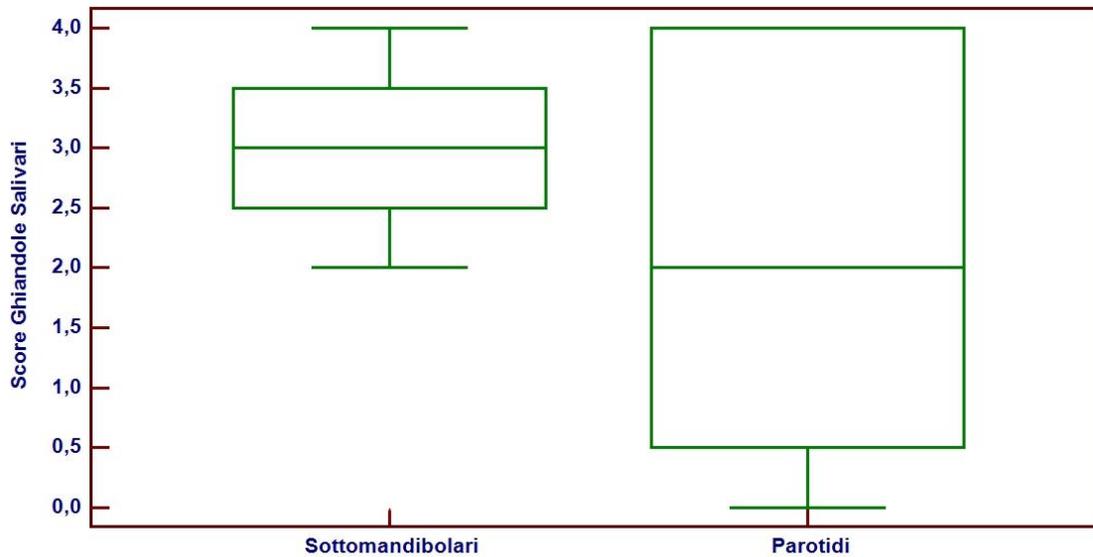


Figura 9. Sottomandibolare: contorno irregolare, multiple aree ipoecogene confluenti (>6 mm), alcune bande iperecogene e modesto sovertimento strutturale, bordo ghiandolare posteriore parzialmente non visibile. Grado 4

**FIGURA 10. Score parotidi Vs sottomandibolari**



**TABELLA IV. ANOVA tra score ecografico del parenchima ghiandolare e caratteristiche dei pazienti**

	SCORE GHIANDOLARE (p)
ETA' (anni)	0,548
Durata di malattia (anni)	0,213
BMI	<b>0,001</b>
PCR	0,034
ANA	<b>&lt; 0,0001</b>

**TABELLA V. Correlazione tra Score Ghiandolare e indici cardiologici**

**(Test di Spearman)**

	<b>PWV (p)</b>	<b>Q-IMT (p)</b>	<b>RFC (p)</b>	<b>ADMA (p)</b>
<b>SCORE GHIANDOLARE</b>	0,140 (r= -0,205)	0,06 (r= 0,261)	0,249 (r= -0,194)	0,075 (r=0,249)

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality and comorbidity of the rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 2009;
- (2) C. P. Mavragani, M. Moutsopoulos. The geoepidemiology of Sjögren's syndrome. *Autoimmunity Reviews* 9, 2010.
- (3) Scofield RH. Genetics of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21(5):448–53.
- (4) Miceli-Richard C, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, Mariette X. Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56(12):3989–94.
- (5) Miceli-Richard C, Gestermann N, Ittah M, Comets E, Loiseau P, Puechal X, et al. The CGGGG insertion/deletion polymorphism of the IRF5 promoter is a strong risk factor for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2009;60(7):1991–7.
- (6) Korman BD, Alba MI, Le JM, Alevizos I, Smith JA, Nikolov NP, et al. Variant form of STAT4 is associated with primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun* 2008;9(3):267–70.
- (7) Nordmark G, Kristjansdottir G, Theander E, Eriksson P, Brun JG, Wang C, et al. Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun* 2009;10(1):68–76.
- (8) Mamtani M, Anaya JM, He W, Ahuja SK. Association of copy number variation in the FCGR3B gene with risk of autoimmune diseases. *Genes Immun* 2009
- (9) Triantafyllopoulou, A.N. Tapinos & H.M. Moutsopoulos. Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2004. 50(9): 2897–2902.

- (10) Nikolaos V Sipsas, Maria N.Gamaletsou and Haralampos M.Moutsopoulos. Is Sjögren's syndrome a retroviral disease? Sipsas et al. *Arthritis Research & Therapy* 2011, 13:212
- (11) Moutsopoulos HM, Papadopoulos GK: Possible viral implication in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Eur J Med* 1992, 4:219-223.
- (12) Karaiskos D, Mavragani CP, Makaroni S, Zinzaras E, Voulgarelis M, Rabavilas A et al. Stress, coping strategies and social support in patients with primary Sjögren's syndrome prior to disease onset: a retrospective case-control study. *Ann Rheum Dis* 2009;68(1):40–6.
- (13) Shim GJ, Warner M, Kim HJ, Andersson S, Liu L, Ekman J, et al. Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(34):12628–33.
- (14) Laine M, Porola P, Udby L, Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N, et al. Low salivary dehydroepiandrosterone and androgen-regulated cysteine-rich secretory protein 3 levels in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56(8):2575–84.
- (15) Spachidou MP, Bourazopoulou E, Kapsogeorgou EK et al (2005). Functional Toll-like receptors (TLRs) are expressed by cultured salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression of TLR-1, -2 and -4 in cells derived from patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 52: 278
- (16) DI Mitsias, EK Kapsogeorgou, HM Moutsopoulos; Sjögren's syndrome: why autoimmune epithelitis? *Oral Diseases* (2006) 12, 523–532.
- (17) Barone F, Bombardieri M, Manzo A et al (2005). Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 52: 1773–1784.
- (18) Salomonsson S, Larsson P, Tengner P, Mellquist E, Hjelmstrom P, Wahren Herlenius M (2002). Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the

target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol* 55: 336–342.

(19) Parkin B, Chew JB, White VA, Garcia-Briones G, Chhanabhai M, Rootman J (2005). Lymphocytic infiltration and enlargement of the lacrimal glands: a new subtype of primary Sjögren's syndrome? *Ophthalmology* 112: 2

(20) R.Fox, P.Creamer. Clinical manifestations of Sjögren's syndrome: exocrine gland disease 040–2047.

(21) M. Cojocaru, Inimioara Mihaela Cojocaru, Isabela Silosi, Camelia Doina Vrabie. Pulmonary Manifestations of Systemic Autoimmune Diseases. *Maedica, A Journal of Clinical Medicine*, Volume 6 No.3 2011

(22) M. Voulgarelis, H.M. Moutsopoulos. Malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *IMAJ* 2001; 3: 761-766

(23) John G. Routsias & Athanasios G. Tzioufas. Sjögren's Syndrome: Study of Autoantigens and Autoantibodies. *Clinic Rev Allerg Immunol* (2007) 32:238–251

(24) Chiara Baldini, Rosaria Talarico, Athanasios G. Tzioufas, Stefano Bombardieri. Classification criteria for Sjögren's syndrome: A critical review. *Journal of Autoimmunity* 39 (2012) 9e14

(25) C Vitali, S Bombardieri, R Jonsson, H M Moutsopoulos, E L Alexander, S E Carsons, T E Daniels, P C Fox, R I Fox, S S Kassan, S R Pillemer, N Talal, M H Weisman, and the European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554–558

(26) Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell L, Baer A, Challacombe S, Lanfranchi H, Schiødt M, Umehara H, Vivino F, Zhao Y, Dong Y, Greenspan D, Heidenreich AM, Helin P, Kirkham B, Kitagawa K, Larkin G, Li M, Lietman T, Lindegaard J, McNamara N, Sack K, Shirlaw P, Sugai S, Vollenweider C, Witcher J, Wu A, Zhang S, Zhang W, Greenspan J, Daniels T; Sjögren's International Collaborative

Clinical Alliance (SICCA) Research Groups. American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012; 64: 475-87.

(27) Turiel M, Sitia S, Atzeni F, Tomasoni L, Gianturco L, Giuffrida M, et al. The heart in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2010;9:414–8. 2. Sitia S, Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Di Bello V, Tomasoni L, Delfino L, et al. Cardiovascular involvement in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2009;8:281–6.

(28) Wallberg-Jonsson S, Ohman ML, Dahlqvist SR. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden. *J Rheumatol*. 1997;24:445-451.

(29) Susan Manzi, Elaine N Meilahn, Joan E Rairie, Claudia G. Conte, Thomas A. Medsger, Linda Jansen-McWilliams, Ralph B. D'Agostino, and Lewis H. Kuller. Age-specific Incidence Rates of Myocardial Infarction and Angina in Women with Systemic Lupus Erythematosus: Comparison with the Framingham Study. *American Journal of Epidemiology*, 1997, vol. 145.

(30) John M. Esdaile, Michal Abrahamowicz, Tamara Grodzicky, Yin Li, Constantina Panaritis, Roxane du Berger, Robert Coté, Steven A. Grover, Paul R. Fortin, Ann E. Clarke and Jean-Luc Senecal. Traditional Framingham Risk Factors Fail to Fully Account for Accelerated Atherosclerosis in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 44, No. 10, October 2001, pp 2331–2337.

(31) Yehuda Shoenfeld, Roberto Gerli, Andrea Doria, Eiji Matsuura, Marco Matucci Cerinic, Nicoletta Ronda, Luis J. Jara, Mahmud Abu-Shakra, Pier Luigi Meroni, Yaniv Sherer. Accelerated Atherosclerosis in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Circulation*. 2005;112:3337-3347

(32) Goodson NJ et al. Baseline levels of C-reactive protein and prediction of death from cardiovascular disease in patients with inflammatory polyarthritic: a

ten-year follow-up study of a primary care-based inception cohort. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2293-9.

(33) Pérez-De-Lis M. et al. "Cardiovascular risk factors in primary Sjögren's syndrome: a case-control study in 624 patients." *Lupus*. 2010 Jul;19(8):941-8.)

(34) Juarez M et Al. "Cardiovascular risk factors in women with primary Sjögren's syndrome: United Kingdom primary Sjögren's syndrome registry results." *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014 May;66(5):757-64.)

(35) (Szántó A. et Al. "Decreased human paraoxonase-1 activity in patients with Sjögren's syndrome." *Int Immunol*. 2010 Jul;22(7)).

(36) Çiçek OF. et Al. "Assessment of the relationship between aortic stiffness and left ventricular functions with echocardiography in patients with Sjögren's syndrome." *Int J Rheum Dis*. 2014 Jul;17(6):658-63.

(37) Bartoloni E. et Al. "Characterization of circulating endothelial microparticles and endothelial progenitor cells in primary Sjögren's syndrome: new markers of

(38) Akyel A. et Al. "Endothelial dysfunction in primary Sjögren syndrome." *West Indian Med J*. 2012 Dec;61(9):870-2.

(39) Vaudo G. et Al. "Precocious intima-media thickening in patients with primary Sjögren's syndrome". *Arthritis Rheum*. 2005 Dec;52(12):3890-7.)hronic endothelial damage?" *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Sep 4

(40) Sabio JM et Al. "Prevalence of and factors associated with increased arterial stiffness in patients with primary Sjögren's syndrome." *Arthritis Care Res*. 2014

(41) Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 1993; 329: 2002–12

(42) Cooke JP, Dzau VS. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*, 1997; 48: 489–509

(43) Vito De Gennaro Colonna, Mauro Bianchi, Valerio Pascale, Paolo Ferrario, Franca Morelli, Walter Pascale, Livio Tomasoni, Maurizio Turiel Asymmetric

dimethylarginine (ADMA): An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Med Sci Monit*, 2009.

(44) Xu-Meng Chen, Chang-Ping Hu, Yuan-Jian Li, Jun-Lin Jiang. Cardiovascular risk in autoimmune disorders: Role of asymmetric dimethylarginine. *European Journal of Pharmacology*. September 2012. [Epub ahead of print]

(45) Rainer H. Boger. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovascular Research* 59 (2003) 824–833

(46) Manuela Di Franco, Francesca Romana Spinelli, Alessio Metere, Maria Chiara Gerardi, Virginia Conti, Francesca Boccalini, Cristina Iannuccelli, Francesco Ciciarello, Luciano Agati and Guido Valesini. Serum Levels of Asymmetric Dimethylarginine and Apelin as Potential Markers of Vascular Endothelial Dysfunction in Early Rheumatoid Arthritis. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation Volume 2012*.

(47) Surdacki A, Martens-Lobenhoffer J, Wloch A, Marewicz E, Rakowski T, Wieczorek-Surdacka E, Dubiel JS, Pryjma J, Bode-Böger SM. Elevated plasma asymmetric dimethyl-L-arginine levels are linked to endothelial progenitor cell depletion and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Mar;56(3):809-19.

(48) Turiel M, Tomasoni L, Delfino L, Bodini B, Bacchiani G, Atzeni F, Sarzi-Puttini P, De Gennaro Colonna V. Clinical implications of assessing coronary flow reserve and plasma asymmetric dimethylarginine in early rheumatoid arthritis. *Eur J Echocardiogr* 2007; 8: S35.

(49) Bultink IE, Teerlink T, Heijst JA, Dijkmans BA, Voskuyl AE. Raised plasma levels of asymmetric dimethylarginine are associated with cardiovascular events, disease activity, and organ damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2005 Sep;64(9):1362-5.

(50) Yvonne Plantinga, Soner Dogan, Diederick E. Grobbee and Michiel L. Bots. Carotid intima-media thickness measurement in cardiovascular screening

programmes. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* 2009, 16:639–644.

(51) Tyrrell PN et Al. "Rheumatic disease and carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 May;30(5):1014-26

(52) Van Sijl AM et Al."Carotid intima media thickness in rheumatoid arthritis as compared to control subjects: a meta-analysis." *Semin Arthritis Rheum.* 2011 Apr;40(5):389-97.

(53) Targońska-Stepniak B. et Al. "The relationship between carotid intima-media thickness and the activity of rheumatoid arthritis." *J Clin Rheumatol.* 2011 Aug;17(5):249-55

(54) Joseph F. Polak, Michael J. Pencina, Karol M. Pencina, Christopher J. O'Donnell, Philip A. Wolf and Ralph B. D'Agostino. Carotid-Wall Intima–Media Thickness and Cardiovascular Events. *n engl j med* 365;july 21, 2011

(55) Matthias W. Lorenz, Hugh S. Markus, Michiel L. Bots, Maria Rosvall and Matthias Sitzer. Prediction of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation.* 2007;115:459-467

(56) Stephane Laurent, John Cockcroft, Luc Van Bortel, Pierre Boutouyrie, Cristina Giannattasio, Daniel Hayoz, Bruno Pannier, Charalambos Vlachopoulos, Ian Wilkinson and Harry Struijker-Boudier on behalf of the European Network for Non-invasive Investigation of Large Arteries. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *European Heart Journal* (2006) 27, 2588–2605

(57) Chue CD, Townend JN, Steeds RP, Ferro CJ. Arterial stiffness in chronic kidney disease: causes and consequences. *Heart* 2010 Jun;96(11):817-23

- (58) Justine Ina Davies and Allan D. Struthers. Pulse wave analysis and pulse wave velocity: a critical review of their strengths and weaknesses. *Journal of Hypertension* 2003, 21:463–472
- (59) Stanley S. Franklin. Beyond blood pressure: Arterial stiffness as a new biomarker of cardiovascular disease. *Journal of the American Society of Hypertension* 2(3) (2008) 140–151.
- (60) Mary J. Roman,, Richard B. Devereux, Joseph E. Schwartz, Michael D. Lockshin, Stephen A. Paget, Adrienne Davis, Mary K. Crow, Lisa Sammaritano, Daniel M. Levine, Beth-Ann Shankar, Elfi Moeller, Jane E. Salmon. Arterial Stiffness in Chronic Inflammatory Diseases. *Hypertension*. 2005;46:194-199.
- (61) Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Delfino L, et al. Decreased coronary flow reserve in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: S196.
- (62) Atzeni F, Sarzi-Puttini P, De Blasio G, Delfino L, Tomasoni L, Turiel M. Preclinical impairment of coronary flow reserve in patients with rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1108: 392-7.
- (63) Yılmaz S. et Al. "Association between serum total antioxidant status and coronary microvascular functions in patients with SLE." *Echocardiography*. 2012 Nov;29(10):1218-23
- (64) Salaffi F. et Al. "Usefulness of ultrasonography and color Doppler sonography in the diagnosis of major salivary gland diseases. *Reumatismo*, 2006; 58(2):138-156
- (65) Bradus RJ, Hybarger P, Gooding GAW. Parotid gland: US findings in Sjögren's syndrome. *Radiology* 1988; 169: 749-51
- (66) Spath M, Kruger K, Dresel S, Grevers G, Vogl T, Schattenkirchner M. Magnetic resonance imaging of the parotid gland in patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1991; 18: 1372-8

- (67) Salaffi F, Argalia G, Carotti M, Giannini FB, Palombi C. Salivary gland ultrasonography in the evaluation of primary Sjögren's syndrome. Comparison with minor salivary gland biopsy. *J Rheumatol* 2000;27:1229–36)
- (68) F. Salaffi, M. Carotti, A. Iagnocco, F. Luccioli, R. Ramonda, E. Sabatini, M. De Nicola, M. Maggi, R. Priori, G. Valesini, R. Gerli, L. Punzi, G. M. Giuseppetti, U. Salvolini and W. Grassi “Ultrasonography of salivary glands in primary Sjögren's syndrome: a comparison with contrast sialography and scintigraphy” *Rheumatology* 2008;47:1244–1249
- (69) Cornec D. et Al. “Salivary gland ultrasound to diagnose Sjögren's syndrome: a claim to standardize the procedure” *Rheumatology* .(2015) 54 (1): 199-200
- (70) Sahn DJ, De Maria A, Kisslo J, Weyman A. The Committee on M-mode standardization of the American Society of Echocardiography. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978; 58: 1072–113.
- (71) Quiñones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA. Doppler quantification task force of the nomenclature and standards committee of the American Society of Echocardiography. Recommendations for quantification of Doppler Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15: 167–84.
- (72) Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, et al (Advisory Board of the 3rd Watching the Risk Symposium 2004, 13th European Stroke Conference). Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc Dis.* 2004; 18: 346-9
- (73) Teerlink T. Determination of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine in biological samples by HPLC. *Methods Mol Med* 2005; 108: 263–74.
- (74) Gerli R, Vaudo G, Bocchi EB, Schillaci G, Alunno A, Luccioli F, Hijazi R, Mannarino E, Shoenfeld Y. Functional impairment of the arterial wall in primary Sjögren's syndrome: combined action of immunologic and inflammatory factors. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62:712-8.

## **RINGRAZIAMENTI**

I miei ringraziamenti vanno a tutta l'U.O.C. di Reumatologia dell'Ospedale Luigi Sacco di Milano ed in particolare al Dr. Sarzi-Puttini per l'aiuto nella crescita umana e professionale. Al Prof. Doria ed all Prof. Punzi per gli insegnamenti ed i preziosi consigli.

Ringrazio, inoltre, l'U.O. di Cardiologia dell'Ospedale Ortopedico Galeazzi per la collaborazione offertami.

Infine un grazie di cuore ad amici e familiari che mi sono stati accanto in questi anni difficili e di profondo cambiamento personale.