

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E
SPERIMENTALI
INDIRIZZO SCIENZE REUMATOLOGICHE
CICLO XXVI

TITOLO TESI

TERAPIA CON MICOFENOLATO DELL'INTERSTIZIOPATIA POLMONARE
ASSOCIATA A SCLEROSI SISTEMICA - ESPERIENZA MONOCENTRICA

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Supervisore :Ch.mo Prof. Franco Cozzi

Dottorando: Silvia Cardarelli

INDICE

<i>RIASSUNTO</i>	1
<i>ABSTRACT</i>	3
<i>INTRODUZIONE</i>	5
La sclerosi sistemica	5
L'interstiziopatia polmonare	11
Patogenesi	11
Quadro clinico	13
Diagnosi	13
Terapia immunosoppressiva	18
Altre terapie	26
<i>SCOPO DEL LAVORO</i>	28
<i>MATERIALI E METODI</i>	29
Casistica	29
Criteri di inclusione allo studio	29
Criteri di esclusione allo studio	30
Disegno dello studio	30
Parametri di valutazione	31
La classe funzionale NYHA	31
I test spirometrici	31
La TC polmonare ad alta risoluzione	32

Analisi statistica	33
<i>RISULTATI</i>	34
Caratteristiche dei pazienti al baseline	34
Follow up dello studio	35
Classe funzionale NYHA	35
Test spirometrici	37
HRCT	40
Effetti avversi	41
<i>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</i>	42
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	45

RIASSUNTO

Presupposti dello studio

L'interstiziopatia polmonare (ILD) costituisce l'impegno viscerale più frequente della sclerosi sistemica (SSc) nonché la principale causa di morte. Poiché la prima fase del processo è una alveolite immunomediata che innesca poi la fibrosi, negli ultimi anni sono stati effettuati numerosi studi per dimostrare l'efficacia di farmaci immunosoppressori come terapia della interstiziopatia. Sono stati utilizzati soprattutto la ciclofosfamide (CYC), l'azatioprina (AZA) e il micofenolato mofetile (MMF). Anche molti pazienti affetti da SSc complicata da ILD afferenti all'U.O.C. di Reumatologia del complesso Azienda Ospedaliera-Università di Padova sono stati trattati negli ultimi anni con terapia immunosoppressiva.

Scopo

Scopo dello studio è stato quello di valutare gli effetti della terapia con MMF come farmaco di prima linea sulla interstiziopatia polmonare (ILD) in un gruppo di pazienti sclerodermici. Questi sono stati confrontati con gli effetti osservati utilizzando come terapia immunosoppressiva la CYC per os seguita dall'AZA in un gruppo storico di pazienti sclerodermici pure affetti da ILD. È stato inoltre valutato il profilo di sicurezza di ciascuno dei farmaci immunosoppressori impiegati.

Casistica e metodi

Sono stati indagati 18 pazienti con SSc complicata da ILD, trattati con MMF come terapia di prima linea per 2 anni confrontati con 15 pazienti trattati per un anno con CYC per os e per un secondo anno con AZA. I due gruppi di pazienti sono stati valutati al baseline, dopo 12 mesi e dopo 24 mesi di terapia. Sono stati considerati i seguenti parametri: test spirometrici (FVC e DLCO), score HRCT e classe NYHA. Per l'analisi statistica sono stati utilizzati il test chi-quadrato, il test t di Student e il Wilcoxon signed rank test.

Risultati

I dati al baseline mostravano che i due gruppi di pazienti apparivano omogenei prima di iniziare la terapia immunosoppressiva.

Nel gruppo trattato con MMF nessun paziente è peggiorato nella classe funzionale NYHA; le prove respiratorie hanno mostrato una stabilità media della funzione polmonare e nessun paziente è progredito nello score TC.

Nel gruppo di confronto trattato sequenzialmente con CYC e AZA non si sono evidenziate variazioni significative né della classe funzionale NYHA né delle prove respiratorie né dello score TC.

Dal confronto fra i due gruppi, non è emersa nessuna differenza statisticamente significativa per i parametri clinici presi in considerazione, dimostrando un'efficacia simile del MMF rispetto ad uno schema di terapia immunosoppressiva tradizionale.

Nel gruppo trattato con MMF nessun paziente ha riportato eventi avversi tali da determinare la sospensione del trattamento, mentre nel gruppo di confronto 2 pazienti hanno dovuto sospendere la CYC per leucopenia e 5 hanno sospeso l'AZA, 2 per epatotossicità e 3 per leucopenia. La differenza fra i due gruppi per quanto riguarda gli eventi avversi è risultata statisticamente significativa a favore dell'MMF ($p=0.0046$).

Conclusioni

I dati del nostro studio suggeriscono che la terapia immunosoppressiva con MMF somministrato per un periodo di due anni ha portato ad una stabilizzazione della ILD in un gruppo di pazienti affetti da SSc, come dimostrato dall'andamento dei test respiratori, dello score HRCT e della classe funzionale NYHA. Risultati simili sono stati osservati in un gruppo di pazienti trattati sequenzialmente per due anni con CYC e successivamente AZA

La terapia con MMF è risultata meno gravata da effetti indesiderati in modo statisticamente significativo rispetto al gruppo di confronto trattato con CYC e AZA .

ABSTRACT

Background

Interstitial lung disease (ILD) is the most frequent type of organ involvement and the main cause of death in systemic sclerosis (SSc). The trigger of fibrosis is an immune mediated alveolitis, thus in the last years, several immunosuppressant drugs have been put to the test, mostly cyclophosphamide (CYC), azathioprine (AZA) and mycophenolate mofetil (MMF).

Therefore, also in the Rheumatology Unit of Padua University, in recent years have been treated in with immunosuppressive therapy.

Aim

The aim of our study was to evaluate the efficacy of MMF as a first-line drug on pulmonary function in SSc-related ILD patients and compare them to a historical group of SSc patients treated with CYC followed by AZA.

Moreover, it has been assessed the safety of each immunosuppressant drugs.

Methods

Eighteen patients with SSc-related ILD have been investigated and treated with MMF as first-line therapy for two years.

Fifteen patients, instead have been treated one year with CYC and for and with AZA for the second years.

The two groups of patients have been evaluated at baseline, and then after 12 and 24 months of therapy.

The evaluation parameters were: pulmonary function tests (FVC and DLCO), HRCT score and NYHA class.

The comparison between the two groups was assessed using Pearson's chi-square test, student t test and Wilcoxon signed rank test as statistical approaches.

Results

At baseline, patients characteristics appeared homogeneous between the two groups and non-statistically significant increase of FVC was observed in both groups at month 12 and month 24.

In the group treated with MMF no patient has deteriorated in NYHA functional class, respiratory tests showed an average stability pulmonary function and no patient has progressed in the TC score.

In the control group, treated sequentially with CYC and AZA, has no been shown significant difference in NYHA class, respiratory tests, or in score TC.

Comparing the two groups, no resounding significant difference has been highlighted. for the evaluated clinical parameters, showing similar efficacy of MMF compared to a pattern of traditional immunosuppressive therapy.

In the group treated with MMF no patients reported adverse events than can cause discontinuation of treatment, while in the control group, 2 patients had to interrupt the CYC for leukopenia, and 5 had suspended AZA, 2 for hepatotoxicity and 3 for leukopenia.

The difference between the two groups respect to adverse events was statistically significant in favor of MMF ($p = 0.0046$).

Conclusions

The data of our study suggest that the immunosuppressive therapy with MMF administered for a period of two years has led to a stabilization of ILD in a cohort of SSc patients, as shown by respiratory test, the HRCT score, and functional class NYHA. Similar results have been observed in another group cohort of patients treated sequentially for two years with CYC and AZA.

Besides, MMF treated group presented a significant decrease of side effects, compared to the group treated with CYC and AZA.

INTRODUZIONE

LA SCLEROSI SISTEMICA

La Sclerosi sistemica (SSc) o Sclerodermia è un disordine generalizzato del tessuto connettivo che colpisce la cute e spesso si associa ad interessamento viscerale. La malattia si caratterizza per fibrosi progressiva associata ad alterazioni del microcircolo degli organi coinvolti.

Tale condizione era già nota ai tempi di Ippocrate, ma fu il medico Italiano Carlo Curzio di Polla a descrivere chiaramente per primo nel 1754 una paziente di 17 anni con le caratteristiche della sclerodermia. Il termine “sclerodermia” invece venne usato per la prima volta nel 1836 da Giovanbattista Fantonetti nel descrivere la condizione di un paziente che presentava cute scura ed indurita da sembrare cuoio e limitazione dei movimenti articolari conseguente all’indurimento cutaneo.

La sclerosi sistemica viene classificata tra le Connettiviti sistemiche. (1,2) La sua prevalenza è di 4,5-10 casi per milione di abitanti, con una incidenza compresa tra 10 e 20 nuovi casi all'anno per milione di abitanti; non si osservano significative differenze razziali della malattia. E' nettamente prevalente nel sesso femminile, con un rapporto variabile da 3:1 a 9:1 nelle principali casistiche. Si manifesta più frequentemente tra i 30 e 50 anni, anche se può insorgere in qualsiasi epoca della vita. (3,4) La familiarità non appare molto spiccata; è comunque descritta l'associazione con alcuni antigeni di istocompatibilità (HLA A1, B8, DR1, DR3, DR5, DR11) (5). Si osservano alcuni casi di SSc secondari all'esposizione a sostanze tossiche (resine di cloruro di vinile, idrocarburi aromatici, polveri di silicio, silicone) o farmaci (bleomicina, pentazocina) (6).

L'eziopatogenesi della SSc rimane tuttora in gran parte sconosciuta. Il primum movens del processo fisiopatologico sarebbe rappresentato da un danno endoteliale, con conseguente esposizione, da parte delle cellule endoteliali lese, di nuovi antigeni di superficie, capaci di attivare l'immunità umorale e cellulare. Si osservano inoltre aggregazione ed attivazione delle piastrine, a seguito dell'adesione delle stesse al tessuto sottoendoteliale, ed attivazione del fattore di von Willebrand, liberato dall'endotelio leso, con formazione di microtrombi e conseguenti lesioni ischemiche. Le cellule

immunocompetenti e le piastrine attivate rilasciano citochine che inducono l'attivazione e la proliferazione dei fibroblasti, con conseguente eccessiva produzione di collagene, qualitativamente normale. Le piastrine, tra i diversi mediatori, libererebbero anche endotelina che scatenerrebbe fenomeni locali di vasospasmo, i quali, accanto alla formazione di microtrombi, giustificherebbero la degenerazione e la necrosi tissutale, particolarmente evidenti a livello cutaneo nelle zone acrolocalizzate, ma presenti anche in altri distretti, a conferma del carattere sistemico della malattia (7,8).

La classificazione di Le Roy del 1988 (1) suggerisce la distinzione della SSc in due forme principali, note con i termini di SSc diffusa (SSc-D) e SSc limitata (SSc-L), in relazione all'estensione della sclerosi cutanea, e ad altri parametri clinici, bioumorali e strumentali presenti nelle fasi precoci di malattia. Tale classificazione aveva come obiettivo quello di identificare i pazienti con maggior rischio di complicanze viscerali, importanti dal punto di vista prognostico (9,10).

L'esordio della SSc-L, è in genere rappresentato dal fenomeno di Raynaud, (fdR) che può precedere anche di parecchi anni l'ispessimento e l'indurimento cutaneo, tipicamente nelle sedi acrolocalizzate, talvolta limitato alle sole dita (sclerodattilia), e mai esteso al tronco. Questa forma corrisponde sostanzialmente alla sindrome precedentemente denominata CREST (calcinosi, fdR, esofagopatia, sclerodattilia, teleangectasie) e si caratterizza per lo scarso impegno viscerale che, qualora presente, colpisce l'esofago e meno frequentemente il circolo polmonare. In quest'ultima evenienza si realizza una vasculopatia obliterante delle arteriole polmonari con conseguente ipertensione polmonare isolata, in assenza di interstiziopatia polmonare (interstitial lung disease ILD) (11). Il pattern autoanticorpale più frequente, ma comunque non caratteristico della SSc-L, è l'anti-centromero (ACA), positivo nel 70-80% dei casi (12, 9, 13).

Nella SSc-D la sclerosi cutanea insorge classicamente entro un anno dall'esordio del fdR, e può estendersi a tutta la superficie corporea, compreso il tronco. L'impegno viscerale è in genere precoce e coinvolge il polmone (80% dei casi), con fibrosi interstiziale bilaterale localizzata soprattutto alle basi (14), l'apparato gastro-enterico, in modo particolare l'esofago nel suo tratto distale (60-90% dei casi), il cuore (50% dei casi) con fibrosi progressiva del miocardio comune e del tessuto di conduzione (15), il rene con possibile evoluzione verso l'insufficienza renale e/o la "crisi renale"

caratterizzata da insufficienza renale rapidamente progressiva e ipertensione maligna (16). La specificità autoanticorpale più frequente ma non specifica della SSc-D è per la topoisomerasi I (anti-Scl-70), positiva nel 40% circa dei casi (12). Altre classificazioni, in particolare quella italiana di Giordano et al. (17), partendo da uno studio di Bamett del 1978, arrivarono ad una nuova suddivisione della SSc, comprendente tre subsets, rispettivamente SSc diffusa, intermedia, limitata, in relazione alla estensione delle sclerosi cutanea raggiunta entro due anni dalla sua comparsa.

Per la diagnosi sono ampiamente accettati i criteri rivisti nel 1987 dall'American College of Rheumatology (ARA), in base ai quali la presenza di sclerodermia prossimale alle dita (criterio maggiore) è già sufficiente, oppure devono essere soddisfatti almeno due dei tre criteri minori: la sclerodattilia, la fibrosi bilaterale alle basi polmonari, le ulcere necrotiche alle dita o la perdita di sostanza alle falangi distali (18).

Questi criteri hanno una sensibilità del 97% ed una specificità del 98%. In base ad essi il fdR, anche se di entità tale da dare sclerodattilia, non è sufficiente a porre diagnosi di SSc e furono per questo giudicati inadeguati per la diagnosi di forma limitata, non permettono nemmeno una diagnosi precoce di SSc.

Le Roy (19) nel 2001 ha proposto nuovi criteri diagnostici per la sclerodermia early, che prevedono la documentazione obiettivata del fdR e in aggiunta, anomalie del microcircolo (megacapillari e/o aree di devascularizzazione), valutate mediante videocapillaroscopia del letto periungueale o positività agli auto-anticorpi specifici della SSc. Se il fR è solo soggettivo sono richiesti sia la specificità auto-anticorpale che il pattern capillaroscopico (20).

Nel 2009 la European League Against Rheumatism EULAR/EUSTAR ha proposto un altro set di criteri per la diagnosi di very early SSc. Tra i criteri maggiori ci sono: fdR, autoanticorpi specifici: (ANA, ACA, anti scl-70) e un pattern diagnostico di videocapillaroscopia. Tra i criteri minori: calcinosi, ulcere digitali, disfunzione dello sfintere esofageo inferiore, puffy hands, teleangectasie ed evidenza di ground glass all'HRCT. La diagnosi di very early SSc si potrebbe porre soddisfacendo tutti e tre i criteri maggiori o due criteri maggiori e uno minore (20).

Sulla scorta di questa esperienza nel 2013 sono stati pubblicati i nuovi criteri classificativi per la SSc. Il lavoro è stato sviluppato dal comitato congiunto ACR ed EULAR, usando il metodo del consensus conference. I nuovi criteri sono risultati migliori rispetto a quelli ACR del 1980 sia per sensibilità che per specificità e dovrebbero consentire di classificare correttamente un maggior numero di pazienti. Essi prevedono uno score basato su 8 criteri e relativi sub-item (Ispessimento cutaneo delle dita di entrambe le mani prossimale alle MCF-criterio sufficiente-; ispessimento cutaneo delle dita (sub-item: dita edematose, sclerodattilia distale alle MCF, ma prossimale IFP); lesioni digitali (sub-item: ulcere digitali del polpastrello, Pitting scars - ipercheratosi-); teleangectasie; anomalia dei capillari del distretto periungueale; ipertensione polmonare e/o interstiziopatia polmonare; FdR; Anticorpi scleroderma correlati (sub-item: un anticorpo tra anti-centromero, anti-topoisomerasi-I, anti-RNA polimerasi III). Questi criteri sono applicabili a tutti i pazienti considerati per l'inclusione in uno studio SSc. I criteri non sono applicabili ai pazienti con ispessimento della pelle che non interessa le dita o per i pazienti che hanno una malattia sclerodermia-like che spiega meglio le loro manifestazioni (ad esempio, la fibrosi nefrogenica sclerosante, morfea generalizzata, fascite eosinofila, scleredema diabeticorum, Scleromixedema, erithromialgia, porfiria, lichen sclerosi, graft-versus-host-disease, cheiroartropatia diabetica) (21)

La SSc ha un'evoluitività molto variabile, che va da forme nelle quali la sclerosi cutanea rimane per anni solo acrolocalizzata e non compaiono impegni viscerali, a forme nelle quali le lesioni si estendono rapidamente a tutte le zone cutanee, compreso il tronco, e che si complicano con alterazioni a carico di vari organi (22).

La malattia presenta comunque periodi di attività alternati a periodi di remissione; sono descritte anche regressioni spontanee, di solito parziali, delle lesioni cutanee. Ciò rende più difficile il giudizio sulla reale efficacia delle terapie somministrate (23).

La prognosi della sclerodermia è condizionata dall'impegno viscerale, soprattutto polmonare, cardiaco e renale.

La sopravvivenza è migliorata notevolmente negli ultimi trent'anni. Nel 2007 Steen e Medsger (24) hanno pubblicato uno studio sulle cause di morte de pazienti sclerodermici analizzando il trentennio 1972-2002. Hanno riportato un notevole

miglioramento della sopravvivenza a 10 anni, passata dal 54% negli anni 70 al 66% negli anni 90. A questo risultato hanno sicuramente contribuito gli ACE-inibitori, efficace terapia della crisi renale sclerodermica. Emerse invece che la fibrosi polmonare e l'ipertensione polmonare avevano soppiantato la crisi renale sclerodermica come principali cause di morte sclerodermia-correlata. Questo dato è stato confermato anche dal più recente report di EULAR/EUSTAR (25) il quale ha evidenziato che su 234 sclerodermici deceduti, il 55% era morto per cause direttamente SSc-correlate, di questi il 35% per fibrosi polmonare e il 26% di ipertensione arteriosa polmonare. Tra le morti non SSc-correlate le principali cause sono risultate: infezioni, neoplasie e malattie cardiovascolari. Dei 14 pazienti deceduti per carcinoma polmonare, 9 avevano concomitante fibrosi.

Questo studio quindi non solo ha rimarcato come la fibrosi polmonare e l'ipertensione arteriosa polmonare siano i due principali determinanti della mortalità SSc-correlata, ma anche come contribuiscano alla mortalità non SSc-correlata.

La terapia della SSc rappresenta tuttora un compito arduo e per certi versi ancora irrisolto e prevede l'impiego di farmaci che interferiscono a vari livelli nella patogenesi della malattia, le cui tappe fondamentali sono quella vascolare, caratterizzata dai fenomeni di vasospasmo e dal danno endoteliale; quella immunitaria, consistente essenzialmente in un'attivazione dei linfociti T; quella fibrotica, che comporta un'anomala stimolazione dei fibroblasti con conseguente eccessiva deposizione di matrice extracellulare. Si utilizzano dunque farmaci vasoattivi (vasodilatatori ed endotelioprotettori), farmaci immunosoppressori e farmaci antifibrotici.

A tutti i pazienti vengono consigliate misure generali come evitare l'esposizione al freddo e la cessazione dell'abitudine al fumo.

I farmaci vasodilatatori contrastano le alterazioni vascolari caratteristiche della SSc, in particolare il fdR. I più usati sono i calcioantagonisti, soprattutto la Nifedipina e il Diltiazem, che riducono il vasospasmo migliorando il fdR aumentando la perfusione tissutale e riducendo le resistenze vascolari; gli ACE-inibitori che ad alte dosi costituiscono la terapia di elezione della crisi renale sclerodermica bloccando il decorso dell'insufficienza renale ed evitando il ricorso alla dialisi; i sartanici che esplicano l'azione vasodilatatrice in quanto antagonisti dell'angiotensina II; i prostanoidi che

hanno un potente effetto vasodilatatore ed azione endotelioprotettiva. Questi ultimi sono indicati pertanto nel trattamento del fdR severo e nelle ulcere ischemiche, che ne costituiscono la sua complicanza, e nell'ipertensione polmonare. Vengono associati spesso gli antiaggreganti piastrinici nei pazienti con ulcere ischemiche.

Tra i farmaci interferenti con il metabolismo del collagene, interferendo in "vitro" con le funzioni dei fibroblasti e limitando l'eccessivo deposito della matrice extracellulare, è stata largamente impiegata la D-penicillamina, che ha anche un effetto immunomodulante. Numerosi farmaci immunosoppressori sono stati sperimentati nella SSc, viste le molteplici alterazioni immunologiche che la caratterizzano. Tali farmaci interferiscono con l'attivazione immunitaria, soprattutto T-linfocitaria, che caratterizza le fasi della malattia nelle quali il processo patologico rimane attivo. Effetti positivi in pazienti con malattia molto severa sono stati descritti con l'impiego della ciclofosfamide (CYC), nelle fasi precoci della fibrosi polmonare, e dell'azatioprina (AZA). Più limitate sono le esperienze con il methotrexate e la ciclosporina, con risultati favorevoli sulle lesioni cutanee. Negli ultimi dieci anni il Micofenolato mofetile (MMF), inibitore della sintesi de novo delle purine, sta emergendo come una terapia utile, non solo per il trapianto degli organi solidi, dove ha trovato la sua prima indicazione, ma anche in diverse malattie autoimmuni, in gran parte in sostituzione dell'AZA (26,27).

In pazienti con malattia molto aggressiva e complicanze viscerali severe è stato utilizzato negli ultimi anni, come trattamento immunosoppressivo, il trapianto autologo di cellule staminali (28).

I farmaci immunosoppressori sono stati impiegati anche in associazione con le tecniche aferetiche (plasmaferesi e fotoferesi), in particolare la plasmaferesi è stata utilizzata nel trattamento a lungo termine delle forme cliniche severe a rapida evoluzione con esordio in forma rapidamente diffusa. Il razionale di questa metodica terapeutica è dato dall'asportazione dal circolo di autoanticorpi, immunocomplessi, citochine, molecole di adesione, grow factors ed altri mediatori solubili implicati nella patogenesi delle lesioni sclerodermiche (29, 30).

L'ipertensione arteriosa polmonare viene trattata con antagonisti dei recettori dell'endotelina (bosentan, ambrisentan), inibitori della fosfodiesterasi (sildenafil),

prostanoidi in infusione continua endovena (eporostenolo) o per via inalatoria (iloprost) (31,32).

La crisi renale sclerodermica viene controllata bene dagli ACE-inibitori (33).

Le turbe della conduzione intracardiaca vengono trattate con antiaritmici o con l'impianto di pacemaker.

Eventi infiammatori come artrite, miositi, tendiniti, sierositi rispondono bene al cortisone a dosi medio-basse.

Le turbe gastrointestinali vengono gestite con i procinetici e con cicli periodici di disinfettanti intestinali, tra i gastroprotettori vengono prediletti gli inibitori di pompa protonica, alternativamente agli antagonisti del recettore H2.

L'INTERSTIZIOPATIA POLMONARE SCLERODERMICA

L'interstiziopatia polmonare (ILD) interessa il 60-70% dei pazienti sclerodermici, come evidenziato da uno studio italiano multicentrico condotto su oltre 1000 pazienti ed è un fattore limitante la sopravvivenza, rappresentando attualmente la principale causa di morte SSc-correlata (25).

Si associa più frequentemente con la positività per l'anticorpo anti Scl-70 e con la forma diffusa. L'etnia afroamericana e la positività per anti Scl-70 rappresentano fattori di rischio indipendenti per lo sviluppo di interstiziopatia (34). Non è stata rilevata relazione tra l'estensione delle lesioni cutanee e la gravità del coinvolgimento polmonare (35).

Patogenesi

L'interstiziopatia sfocia nella fibrosi interstiziale simmetrica alle basi polmonari, che rappresenta il più frequente quadro istologico. Sebbene negli stadi finali la malattia possa apparire fibrotica e acellulare, studi biotipici spesso mostrano un processo infiammatorio attivo di accompagnamento alla fibrosi. Negli anni è gradualmente emerso il concetto di alveolite infiammatoria come parte integrante dell'ILD. In uno studio eseguito su 49 biopsie polmonari ottenute da 34 pazienti con SSc, Harrison et al. (36) rinvenivano una flogosi intra-alveolare rappresentata da un aumentato numero di macrofagi a questo livello, assieme ad occasionali neutrofili, linfociti ed eosinofili.

Linfociti e plasmacellule erano predominanti nell'interstizio polmonare e occasionali aggregati linfoidi di piccole dimensioni erano rinvenibili adiacenti ai bronchioli o alla pleura.

L'aumento del numero di fibroblasti è evidente nella fibrosi polmonare sclerodermica in fase precoce, mentre l'aumentata sintesi di collagene è riflessa dagli elevati livelli di procollagene di tipo 3°, acido ialuronico e fibronectina riscontrabili nel BAL. L'analisi di quest'ultimo ha evidenziato come sia presente un'alveolite neutrofila nel 50-60% dei casi.

Un aspetto importante nella patogenesi della fibrosi polmonare è sicuramente rappresentato dalla capacità dei fibroblasti di differenziarsi in miofibroblasti. E' verosimile che ciò avvenga sotto lo stimolo di varie citochine. Ad esempio IL-1 e TNF α , citochine di derivazione monocitico-macrofagica, possono agire direttamente sulle cellule polmonari per modificare il loro comportamento ed alterare l'espressione genetica delle proteine della matrice extracellulare.

Due citochine sembrano giocare un ruolo centrale invece nel mantenimento del processo fibrotico: il TGF β e il PDGF. TGF β incrementa la trascrizione dei geni delle proteine collageniche e di altre proteine della matrice extracellulare mentre inibisce la produzione di collagenasi; stimola la proliferazione dei fibroblasti inducendo la secrezione autocrina di PDGF ed aumentando il livello di PDGF-recettore α . PDGF è un potente mitogeno e fattore chemiotattico secreto dai macrofagi e da cellule polmonari quali cellule endoteliali, cellule epiteliali, cellule muscolari lisce e fibroblasti.

In conclusione quindi, sebbene la sequenza degli eventi nella fibrosi polmonare sclerodermica sia sconosciuta, è probabile che essa sia il risultato dell'attivazione fibroblastica e del rimodellamento del tessuto connettivo conseguente ad un'alveolite immunomediata.

Allo sviluppo dell'interstiziopatia potrebbe contribuire anche il reflusso con l'aspirazione del contenuto gastrico, come evidenziato da alcuni studi. Sembrerebbe che la severità del disturbo motorio rilevato alla manometria correli con un più rapido deterioramento degli scambi gassosi alveolari e una più rapida progressione dell'interstiziopatia alla TC (36). Più recentemente il pattern di fibrosi centrolobulare è stato correlato al reflusso (37).

Quadro clinico

Soventemente l'ILD è subdola, rimanendo asintomatica per molti mesi e la sintomatologia clinica compare ad uno stadio già avanzato. Il quadro clinico classico comprende la dispnea da sforzo e la tosse secca, oltre ad uno stato di astenia. Il dolore toracico e l'emoftoe sono infrequenti. All'esame obiettivo si apprezzano crepitazioni secchi in corrispondenza delle basi polmonari. La cianosi e l'ippocratismo digitale si osservano raramente e nelle fasi molto avanzate.

Diagnosi

Le tecniche diagnostiche più frequentemente utilizzate sono rappresentate dai test di funzionalità respiratoria (PFR) e dalla tomografia computerizzata ad alta risoluzione (HRCT). Viene talvolta eseguita anche l'analisi del liquido di broncolavaggio.

In media il 40% dei pazienti sclerodermici presenta alla spirometria un pattern restrittivo (FVC < 50-70% del valore predetto), nel 15% dei casi grave (FVC < 50%). Il deficit restrittivo è definito come FVC < 80% del valore atteso e indice di Tiffenau > 70%. I volumi polmonari sono ridotti, mentre i flussi aerei sono conservati. Anche il volume alveolare rispetto alla capacità polmonare totale è ridotto; nei soggetti normali invece questi due valori sono simili.

La spirometria, oltre che per la diagnosi, è un ottimo strumento per il follow up. Vengono considerati in particolare l'FVC e il DLCO, indicatori indiretti, il primo dell'estensione della fibrosi e il secondo dell'alveolite, del mismatch ventilo-perfusorio e del coinvolgimento dei vasi polmonari. La riduzione del DLCO può quindi essere imputata oltre che all'anemia anche alla perdita della superficie alveolo-capillare, secondaria all'interstiziopatia o alla vasculopatia obliterante dei piccoli vasi polmonari, secondaria all'ipertensione polmonare. Il DLCO da solo non permette quindi di distinguere l'interstiziopatia dall'ipertensione polmonare arteriosa, anche se valori inferiori al 45% fanno propendere per quest'ultima.

Una riduzione isolata del DLCO è osservabile in circa il 20 % dei pazienti sclerodermici. Tra questi pazienti circa il 10%, peraltro in gran parte affetti dalla forma limitata di malattia, ha una severa riduzione del DLCO (inferiore al 55 % del valore predetto) e sviluppa ipertensione polmonare in assenza d'interstiziopatia (38).

Il significato prognostico della riduzione del CO è tuttora discusso. Da un lato, infatti, alcuni studi dimostrano che un valore di DLCO inferiore al 40 % del valore predetto si associa ad una cattiva prognosi con mortalità di circa il 90% a cinque anni (39). Dall'altro lato un autorevole lavoro condotto su un'ampia casistica di pazienti sclerodermici, ha dimostrato che solo una piccola percentuale di pazienti con decurtazione isolata del DLCO, pari all'8%, sviluppa una malattia polmonare severa. A parte questo lavoro, rimane valido il concetto in base al quale la riduzione del DLCO ai test di funzionalità respiratoria, rappresenta l'alterazione funzionale più precocemente osservabile nell'ILD SSc (40).

Alcuni lavori di correlazione con HRCT hanno ribadito che la riduzione del DLCO non è in grado di dirimere tra lesioni polmonari alveolitiche, ancora reversibili, e quelle fibrotiche non suscettibili di regressione. È stato infatti evidenziato che: 1) dal punto di vista funzionale pazienti con pattern HRCT prevalente "a vetro smerigliato" o reticolare sono identici; 2) la severità dell'impegno funzionale non discrimina tra alveolite e fibrosi; 3) la percentuale di DLCO è il parametro di funzionalità respiratoria che meglio correla con l'estensione dell'alveolite fibrosante in assenza di ipertensione polmonare severa; 4) rapportando lo score HRCT con la durata di malattia, FVC, dispnea score, conta cellulare totale del BAL e DLCO, l'unica correlazione statisticamente significativa risultava quella negativa tra score elevato alla HRCT e riduzione del DLCO, in pazienti con una durata media di malattia di 14 mesi (41).

L'HRCT è l'altra indagine fondamentale per porre diagnosi di interstiziopatia. Questa metodica d'indagine radiologica permette di apprezzare le vie aeree fino all'ottava generazione e i vasi fino alla 22esima generazione e di identificare il lobulo secondario. Il suo potere di risoluzione è pari a 200-300 micron e questo ne fa una metodica molto sensibile (90-100%) e specifica per il riconoscimento della ILD-SSc. Prima dell'avvento della TC l'indagine radiologica usata era l'RX del torace che però aveva una sensibilità insoddisfacente: nella serie di Shurawitzki et al. 91% dei pazienti mostrava i segni dell'ILD alla HRCT, mentre all'RX torace solo il 31% degli stessi pazienti mostrava anomalie (42).

La TC poiché espone il paziente a radiazioni ionizzanti non va ripetuta sistematicamente. L'85% dei pazienti con HRCT normale al momento della diagnosi di SSc non sviluppa ILD nei successivi 5 anni (43). Alla luce dei risultati di questo studio

essa va proposta al momento della diagnosi di SSc e, nel caso in cui non mostrasse ILD, dopo 2 anni, oppure come approfondimento diagnostico qualora si evidenziasse alle prove di funzionalità respiratoria un peggioramento della performance respiratoria.

Da un punto di vista semeiologico elementare le lesioni osservabili possono essere distinte in quattro grandi categorie: 1- lesioni lineari e reticolari: espressione del coinvolgimento della rete connettivale che costituisce l'interstizio polmonare; 2- lesioni nodulari: espressione sia di patologia interstiziale che di patologia degli spazi aerei; 3- aumento della densità polmonare: aspetto "a vetro smerigliato" e consolidazione polmonare; 4- riduzione della densità polmonare: rappresentata da lesioni cistiche, aree di distruzione parenchimale, aumento del contenuto aereo o riduzione della componente vascolare parenchimale.

Le lesioni reticolari comprendono l'ispessimento dei setti interlobulari, l'ispessimento dell'interstizio subpleurico, l'ispessimento peribroncovasale, il segno dell'interfaccia ed il polmone ad alveare (il cosiddetto "honey combing").

L'iperdensità a vetro smerigliato ("ground glass") è caratterizzata da un tenue aumento della densità polmonare di fondo tale da non impedire la visualizzazione delle strutture vascolari e bronchiali che l'attraversano.

Numerosi autori si sono impegnati nel cercare di capire quale fosse il limite di affidabilità dell'HRCT nella valutazione dell'ILD-SSc, e se fosse realmente in grado di sostituire la biopsia polmonare toracoscopica, considerata il "gold standard" diagnostico e prognostico.

Wells et al. (44) hanno studiato 12 pazienti sclerodermici eseguendo in tutti HRCT e biopsia polmonare. Il confronto dei risultati ottenuti con le due metodiche rivelava che l'evidenza di un pattern predominante di tipo reticolare alla tomografia corrispondeva ad un quadro istologico di fibrosi diffusa, mentre un pattern tomografico caratterizzato prevalentemente da opacità a "vetro smerigliato" ("ground glass") era con elevata probabilità correlato ad un quadro istologico di infiammazione.

Ulteriori studi cercarono quindi di stabilire se i dati morfologici ottenuti con HRCT fossero in grado di predire in maniera affidabile prognosi e risposta alla terapia dell'alveolite fibrosante. Ancora Wells et al. (45) indagarono con questo proposito 76 pazienti con ILD e 66 pazienti con alveolite fibrosante associata alla SSc, evidenziando

che la migliore sopravvivenza e risposta alla terapia potevano essere osservate nei pazienti con pattern HRCT prevalentemente “a vetro smerigliato”; il gruppo di pazienti con pattern di tipo reticolare presentava invece la più bassa sopravvivenza media e minor risposta alla terapia. Gli sclerodermici con pattern misto (“vetro smerigliato”-reticolare) si collocavano a metà tra i primi due gruppi.

Gli stessi autori (46) studiarono anche la modificazione dell'estensione della malattia dopo terapia (Prednisolone 10 mg/die, Ciclofosfamide 75-100 mg/die), sia in pazienti con ILD che con SSc, ad un intervallo medio di 16 mesi. Al momento della raccolta dei risultati il pattern reticolare non era regredito in nessun paziente, mentre in tutti i casi in cui l'estensione di malattia si era ridotta, questo era dovuto alla regressione delle opacità a vetro smerigliato. I pazienti in cui si era verificato invece un incremento dell'estensione della malattia erano con maggior frequenza quelli che presentavano pattern misto o prevalentemente reticolare. Dallo stesso studio veniva inoltre evidenziato come ad una regressione della componente a “vetro smerigliato” corrispondesse nella maggior parte dei pazienti un miglioramento dei test spirometrici compresa la diffusione alveolo-capillare del CO.

Da questa importante esperienza scientifica possiamo quindi trarre alcune importanti considerazioni tra cui:

- 1) l'aspetto a “vetro smerigliato” è dotato di significato prognostico in quanto, se esso è predominante, è quasi sempre possibile indurre la regressione con appropriata terapia. Questo dato supporta ulteriormente l'evidenza che, essendo il pattern reversibile, corrisponda ad infiltrato infiammatorio.
- 2) se il “vetro smerigliato” si associa in maniera equivalente per estensione ad un pattern reticolare, la risposta alla terapia in termini di riduzione dell'estensione del danno sarà possibile in meno del 50% dei pazienti con un incremento dell'estensione del danno in un terzo dei pazienti.
- 3) in qualche caso l'aspetto a “vetro smerigliato” potrebbe non corrispondere ad infiammazione, potendosi invece trattare di fibrosi intralobulare molto fine che rimane al di sotto delle capacità di risoluzione dell'HRCT.

L'importanza dell'HRCT sta anche nella possibilità di ricavare uno score ampiamente validato e utilizzato anche in studi sull'ILD-SSc (47). Per quanto riguarda l'aspetto

istologico, differentemente rispetto alla (fibrosi polmonare idiopatica (FPI), che ha come corrispettivo anatomopatologico la Usual Interstitial Pneumopathy (UIP), la ILDS-SSc corrisponde al quadro di No-Specific Interstitial Pneumopathy (NSIP) nella maggior parte dei casi (76%). Una minoranza è UIP (11%); nei restanti casi (13%) la fibrosi è talmente estesa da non consentire più una classificazione istologica. Nel caso della sclerosi sistemica non c'è differenza di outcome tra il pattern NSIP e UIP. Ciò che influenza di più la prognosi è piuttosto la gravità dell'interessamento polmonare al momento della diagnosi e il trend di riduzione del DLCO (48). Confrontata con la FPI l'aspetto radiologico è il medesimo, ma la ILDS-SSc ha prognosi meno cattiva. Dato che il quadro istologico non predice la prognosi, oggi la biopsia non viene praticamente più eseguita, se non nei casi di discrepanza tra le manifestazioni cliniche e il reperto tomografico.

Il lavaggio bronco-alveolare (BAL) viene eseguito a completamento della broncoscopia e consiste nell'instillazione e nella successiva aspirazione di soluzione salina all'interno dell'albero tracheobronchiale, consentendo così il recupero di cellule e proteine presenti sulla superficie epiteliale del tratto respiratorio inferiore. Il BAL consente di esaminare circa 10 milioni di alveoli sui circa 300 milioni posseduti dall'adulto normale. Il presupposto di base di tale indagine è che le cellule e le proteine ottenute per lavaggio della superficie epiteliale alveolare sono simili nel tipo, nella quantità e nella funzione, a quelle presenti nell'interstizio polmonare. L'American Thoracic Society (49), l'European Respiratory Society e la Deutsche Gesellschaft für Pneumologie hanno redatto le linee guida per l'esecuzione e l'interpretazione dell'esame. In particolare le percentuali di polimorfonucleati e di linfociti considerate normali sono rispettivamente \leq al 5% e \leq al 15%. Quando tali valori vengono superati si può parlare di alveolite attiva.

Numerosi autori hanno analizzato il BAL di pazienti sclerodermici ottenendo risultati non uniformi. Infatti secondo alcuni di loro l'alveolite presente in corso di SSc si caratterizza per un aumento di linfociti, invece secondo altri sono i neutrofili e gli eosinofili ad essere prevalenti, come avviene in corso di FPI (50, 51).

Pur avendo dimostrato grande valore come strumento di ricerca consentendo una migliore comprensione dei processi immunitari e flogistici che mediano il danno delle strutture polmonari, l'utilizzo nella pratica clinica del BAL risente di molte limitazioni. Tra queste le più importanti sono: 1) scarsa standardizzazione della tecnica; 2) costo

elevato dell'indagine; 3) riluttanza del paziente ad accettarla; 4) difficoltà nell'interpretazione dei risultati e del loro significato clinico.

Terapia immunosoppressiva

Farmaci immunosoppressori non selettivi, già impiegati nel trattamento del cancro o nella prevenzione del rigetto di trapianto, sono stati usati per decenni nel trattamento di malattie autoimmuni anche in ambito reumatologico, soprattutto nel Lupus Eritematoso Sistemico (LES) e nell'artrite reumatoide (AR) (52, 53). Anche nella SSc vengono correntemente impiegati farmaci immunosoppressori, soprattutto per specifici e gravi impegni d'organo come nei casi di rapida progressione della fibrosi cutanea, nella associata malattia articolare e muscolare e soprattutto nell'ILD.

La terapia dell'ILD-SSc non è ben standardizzata. Diversi farmaci sono stati impiegati nel tempo, ma nessuno si è rivelato capace di dare una svolta decisiva alla storia naturale della malattia. Accanto agli immunosoppressori, come la ciclofosfamide (CYC), la ciclosporina A (CsA) l'azatioprina (AZA) e il Micofenolato Mofetile (MMF), con i quali c'è più esperienza nella pratica clinica, nuovi farmaci biotecnologici sono oggetto d'interesse. Tra le nuove molecole sono comparsi il Rituximab e l'Imatinib, con i quali però non sono stati ancora condotti trial clinici randomizzati controllati. Un altro approccio, sicuramente affascinante ma ancora in fase sperimentale, è proposto dalla biologia molecolare con la stem cells therapy. Per i casi più gravi, con fibrosi polmonare estesa e irreversibile, ossigeno-dipendenti il trapianto polmonare rappresenta l'unica possibilità.

Fino agli inizi degli anni '80 la terapia cortisonica, nell'ILD-SSc come in altre forme di interstiziopatia, ha rappresentato un importante strumento terapeutico. Tuttavia, l'impiego di steroidi ad alte dosi, non solo non era in grado di condurre ai risultati auspicati, ma era direttamente implicato nell'insorgenza della crisi renale sclerodermica, grave complicanza d'organo (54). Perciò il cortisone non viene ad oggi più utilizzato come unica terapia dell'interstiziopatia ma in associazione con gli immunosoppressori e a basso dosaggio (5 o 10 mg/die). A partire dagli anni '90 sono stati introdotti nuovi farmaci. Lo studio retrospettivo del 1994 di Steen e collaboratori (55) metteva a confronto 5 gruppi di pazienti sclerodermici con severa ILD, trattati per almeno 6 mesi rispettivamente con: a) alte dosi di cortisone (≥ 30 mg/die per almeno 4 mesi o ≥ 60

mg/die per almeno 2 mesi), b) CYC per via orale ≥ 50 mg/die o boli 500-750 mg/m², c) D penicillamina ≥ 250 mg/die, d) altri immunosoppressori: (AZA ≥ 50 mg/die o MTX $\geq 7,5$ mg/settimana), e) nessun farmaco. Era già noto che il cortisone era efficace solo in una minoranza dei pazienti con FPI e risultati simili si ottennero anche nella ILD-SSc. I pazienti trattati con gli steroidi mostravano una grande variabilità di risposta alle prove di funzionalità respiratoria: solo pochissimi ebbero un netto miglioramento e quei pochi che ne ebbero un certo beneficio erano anche quelli trattati più precocemente nella loro storia di malattia. La CYC si mostrò significativamente più efficace sulla funzionalità polmonare rispetto a tutti gli altri trattamenti. Inoltre, indipendentemente dal farmaco considerato, il fattore maggiormente predittivo di significativo miglioramento era l'inizio precoce della terapia (meno di 4 anni dall'insorgenza della patologia); questo risultato è importante perché conferma come l'infiammazione sia il carattere dominante e ancora reversibile della fase precoce della interstiziopatia, mentre la fibrosi rappresenta l'ultimo e ormai irreversibile stadio della malattia.

L'approccio farmacologico attualmente più comune prevede due linee di trattamento: l'induzione e il mantenimento. Da uno studio di recente pubblicazione emerge che: nel 65 % dei casi viene scelta la CYC somministrata in boli come terapia di induzione, mentre per il mantenimento nella maggior parte dei casi si opta per l'AZA o il MMF. Il 30 % associa steroidi sia nella fase di induzione che nel mantenimento. Questi risultati sono stati ottenuti raccogliendo i pareri di 117 esperti di SSc membri dello Scleroderma Clinical Trials Consortium and Canadian Scleroderma Research Group (56), tra i quali alcuni autori EULAR/EUSTAR. Ancora, secondo questo articolo l'87% degli esperti tratta già i pazienti che presentano dispnea ed evidenza radiologica e strumentale di deficit restrittivo, mentre il 76% tratta anche i pazienti che, benché ancora asintomatici, hanno una certa compromissione della funzione respiratoria evidenziata alla spirometria e alla HRCT. L'obiettivo era quello di ottenere un consensus che fungesse da guida nel management delle varie complicanze della sclerosi sistemica. Infatti nonostante le linee guida di EULAR/EUSTAR del 2009 (27), la letteratura manca di un chiaro algoritmo per la gestione delle varie complicanze di questa patologia sistemica.

La ciclofosfamide

La ciclofosfamide (CYC) è l'agente citotossico più largamente utilizzato nelle forme precoci di ILD, anche se i costi e il profilo di sicurezza rimangono ancora questioni aperte. La CYC è un profarmaco che richiede l'attivazione in vivo a 4-idrossiciclofosfamide, che poi viene trasformata in fosforamide mostarda, che è la forma attiva nei confronti degli acidi nucleici, e acroleina, responsabile della tossicità renale. Una volta legata agli acidi nucleici blocca la replicazione del DNA. I precursori B e T sono particolarmente sensibili alla CYC: si ottiene il calo della produzione anticorpale e la riduzione del numero delle cellule circolanti B CD19+, oltre alla netta deplezione sia dei T CD4+ che dei CD8+. La somministrazione per via orale prevede l'assunzione di 1,5-2,5 mg/kg/die, mentre per la via parenterale 650 mg/m² ogni 1-3 mesi. Quest'ultima via di somministrazione secondo molti sarebbe più efficace e meno tossica della terapia continuativa per via orale. Gli effetti indesiderati sono numerosi e frequenti: nausea, leucopenia, trombocitopenia, anemia, alopecia, cistite emorragica, neoplasie vescicali, sterilità. Sin dagli anni '90 sono stati condotti studi che miravano a valutare l'efficacia di questo farmaco alchilante sull'intero processo di malattia e sulle più specifiche manifestazioni cutanee e respiratorie. Il primo trial randomizzato e controllato venne pubblicato nel 2006. Si trattava dello Scleroderma Lung Study (5), trial multicentrico, a doppio cieco, randomizzato che includeva 158 pazienti trattati o con la CYC alla dose giornaliera di 1-2 mg/kg per via orale o con placebo. I pazienti arruolati mostravano dispnea, deficit restrittivo alle prove di funzionalità respiratoria ed evidenza di infiammazione dell'interstizio polmonare al BAL o alla HRCT. Questo studio mostrava, a 12 mesi dall'inizio del trattamento, un modesto ma significativo aumento del FVC e del TLC, ma non variazioni della diffusione dei gas. Si registrava invece il miglioramento della fibrosi cutanea, delle abilità funzionali, e quindi della qualità di vita, documentato dal miglioramento del HAQ disability index e dell'SF 36 ($p < 0,05$ vs placebo per entrambi i test). Gli stessi autori evidenziavano come l'effetto benefico della CYC fosse temporaneo, non si protrasse cioè oltre i 12 mesi dalla sospensione del trattamento. Come ci si poteva facilmente attendere gli eventi avversi erano più frequenti nel gruppo trattato con CYC rispetto al placebo, nonostante ciò gli autori concludevano per un rapporto rischio -beneficio favorevole.

Un altro trial ha messo a confronto la CYC somministrata per via endovenosa alla dose mensile di 600 mg/m² con il placebo in 45 pazienti con ILD-SSc. Il gruppo trattato attivamente fu sottoposto ad infusioni di CYC per 6 mesi seguite da altri 6 mesi di AZA (2,5 mg/kg al giorno) e cortisone (20 mg a giorni alterni). Tra i due gruppi si notò una differenza nell'entità dell'aumento del FVC, senza raggiungere la significatività statistica. La capacità di diffusione del CO non mostrò miglioramenti (58).

La metanalisi, condotta da Nannini e collaboratori (59), che passava in rassegna 3 studi randomizzati controllati e 6 studi prospettici, concludeva che la CYC non produceva un significativo miglioramento clinico della funzione polmonare. È da sottolineare però come i pazienti dei diversi studi considerati non siano stati tutti selezionati tenendo conto della progressione della malattia polmonare, né in base alla durata della ILD. Gli stessi autori ammettono che è possibile che i pazienti trattati precocemente, ad un iniziale stadio di ILD, possano avere una migliore risposta alla CYC. Sulla base dei due trials randomizzati e controllati di alta qualità sopra descritti EULAR e EUSTAR raccomandano l'uso della CYC nella ILD-SSc.

L'azatioprina

L'azatioprina (AZA) è stata impiegata nelle malattie reumatiche a partire dagli anni '60. Ha trovato impiego nelle forme severe di LES, nell'AR, nell'artrite psoriasica, nella polimiosite e nelle vasculiti.

In ambito reumatologico viene somministrata per os alla dose di 1,5-2,5 mg/kg/die. È inattiva, a livello epatico e negli eritrociti viene trasformata in 6-mercaptopurina che è la forma attiva. È un farmaco antimetabolita, un analogo delle purine, perciò viene incorporato nelle strutture del DNA e dell'RNA, alterando la duplicazione del DNA e la sintesi delle proteine. Questa azione spiega la sua citotossicità. Il meccanismo dell'azione antireumatica risiede invece nell'inibizione della produzione anticorpale e nella modulazione dell'immunità cellulare.

Questo farmaco antimetabolita blocca non solo la sintesi de novo delle purine ma anche la via di salvataggio; non sorprende quindi che accanto all'effetto voluto di inibizione della proliferazione B e T, ci sia l'effetto indesiderato sulla crasi ematica, ovvero leucopenia, trombocitopenia e anemia. Altri effetti indesiderati osservabili in corso di assunzione di AZA sono: nausea, epigastralgie, ipertransaminasemia, pancreatite.

Inoltre, proprio per la sua struttura, viene incorporata nella catena di DNA come base fraudolenta e questo rende conto del suo potenziale mutageno e cancerogeno.

La prima esperienza documentata dalla pubblicazione di un articolo di impiego dell'AZA nella ILD-SSc risale al 2004. L'AZA era già all'epoca largamente impiegata nel management della FPI ove migliorava la funzione polmonare e la sopravvivenza. Si trattava di uno studio retrospettivo su 11 pazienti che mirava a valutare l'efficacia dell'AZA associata a basse dosi di cortisone nella Ssc-ILD; 3 pazienti smisero la terapia prima del sesto mese per insorgenza rispettivamente di nausea, leucopenia e tubercolosi polmonare, ma tutti gli altri dopo 12 mesi di trattamento mostravano una funzione polmonare migliorata o stabile (60). Il trial randomizzato pubblicato nel 2004 (61) confrontava la CYC e l'AZA evidenziando la superiorità della prima: FVC e DLCO si mantennero stabili nei 30 pazienti che ricevettero la CYC, mentre peggiorarono in misura statisticamente significativa negli altri 30 trattati con l'AZA.

Si fece quindi spazio l'idea di usare l'AZA come mantenimento, dopo l'induzione con CYC. Lo studio randomizzato, prospettico di Hoyles et al. suggeriva che l'approccio con 20 mg/die di prednisolone e boli mensili di CYC per 6 mesi, seguiti da AZA per os, pur non proponendosi come l'ideale, poteva rappresentare un'opzione terapeutica, tra l'altro ben tollerata (58). Un altro studio retrospettivo dimostrava stabilizzazione o miglioramento dei test di funzionalità respiratoria dopo 6 mesi di boli mensili di CYC seguiti da 18 mesi di AZA (62).

Il micofenolato mofetile

La CYC è il farmaco più diffusamente utilizzato nel trattamento della ILD-SSc, però dato il suo profilo di tossicità, la ricerca si è rivolta all'identificazione di un trattamento alternativo che fosse parimenti efficace ma meno tossico. È emerso quindi il MMF, già largamente usato nella prevenzione del rigetto.

Il MMF è un derivato semisintetico dell'acido micofenolico, isolato dalla muffa di *Penicillium glaucum*.

Il MMF è il profarmaco dell'acido micofenolico, un inibitore reversibile dell'inosina monofosfato deidrogenasi (IMPDH). L'IMPDH è il passaggio che limita la velocità di sintesi de novo delle purine.

Nell'organismo umano sono presenti due isoforme dell'enzima: la prima costitutivamente attiva e presente in tutte le cellule, la seconda di tipo inducibile. È stato dimostrato che stimolazione dei linfociti in vitro, indotta con fitoemoagglutinina o dal virus di Epstein–Barr, determina aumento dell'espressione dell'isoforma inducibile della IMPDH (63,64). È stato inoltre provato che tra i due tipi di enzima quello inducibile è circa cinque volte più sensibile all'azione dell'acido micofenolico (MPA) rispetto alla forma costitutiva ed è quindi per tale motivo che l'acido micofenolico risulta un potente citostatico per i linfociti attivati. Il blocco della sintesi delle purine determina l'arresto della replicazione cellulare in fase S e quindi l'arresto della proliferazione clonale del linfocita T, B e anche dei macrofagi (63), mentre vengono risparmiate le linee cellulari ematopoietiche ed epiteliali cui è sufficiente la sola via di salvataggio delle purine.

Vi sono altri meccanismi d'azione dell'acido micofenolico che contribuiscono a spiegarne l'effetto immunosoppressivo. In primo luogo il MMF induce l'apoptosi dei linfociti T attivati in risposta ad uno stimolo antigenico, che rappresenta uno dei principali meccanismi con cui si instaura la tolleranza immunologica (66). In secondo luogo inibisce la differenziazione, la maturazione e la funzione allostimolatoria delle cellule dendritiche di derivazione monocitaria (66). Inoltre, interferisce con la funzione delle cellule dendritiche senza inibirne la maturazione (67), inibisce la produzione di cellule mesangiali murine ed umane (68), inibisce la glicosilazione delle molecole di adesione (68), inibisce l'esposizione di alcune molecole sulla superficie dei monociti che ne permettono l'emarginazione (69). Infine, agendo sulla ossido nitrico sintetasi inducibile, diminuisce la produzione di perossinitriti e di conseguenza i danni indotti sulle cellule dagli stessi (70). Il MMF oltre all'effetto immunosoppressivo ha anche un'attività antifibrotica. Recenti studi infatti mostrano che il MMF in vitro inibisce la produzione di collagene, diminuisce la proliferazione dei fibroblasti e riduce l'accumulo di miofibroblasti attivati. È interessante ciò che hanno osservato Mendoza e colleghi in 3 pazienti affetti da SSc sottoposti a biopsia cutanea prima e dopo trattamento con MMF: riduzione di spessore dei fasci di collagene e ricomparsa dei follicoli piliferi, delle ghiandole sebacee e sudoripare. Queste osservazioni sono coerenti con i risultati dell'analisi molecolare condotta con rt-PCR sugli stessi campioni, che documenta una diminuita espressione di geni della fibrosi, come TGF- β , connective TGF, collagene, fibronectina 1 e smooth muscle actin (71).

Questo farmaco viene assunto per via orale e viene ben assorbito e trasformato completamente nel suo metabolita attivo (MPA).

La biodisponibilità del MMF è pari al 95% nei soggetti sani e ad un 80% nei trapiantati. Una volta in circolo il farmaco si lega all'albumina in una percentuale pari al 97%. Studi in vitro hanno dimostrato che solo la quota libera di tale principio attivo è in grado di inibire l'enzima IMPDH (63). Dopo somministrazione orale, il primo picco di concentrazione plasmatica viene raggiunto dopo circa un'ora, successivamente si ha un rapido declino della concentrazione plasmatica seguito da un secondo picco dopo 6-12 ore, dovuto al ricircolo entero-epatico. MPA viene metabolizzato in un derivato inattivo dalla UDP-glucosiltransferasi a livello di fegato, polmone e tratto gastrointestinale. Un ruolo importante nella farmacocinetica del MMF è svolto dal ricircolo entero-epatico poiché una volta escreto con la bile MPA-glucuronide viene riconvertito nuovamente in acido micofenolico, suo precursore, grazie all'azione delle glucuronidasi della flora intestinale (72).

Il MMF è largamente usato per prevenire il rigetto di trapianto, mentre in ambito reumatologico è usato principalmente nel LES. È entrato più recentemente rispetto ai due farmaci in precedenza descritti a far parte delle opportunità terapeutiche della ILD-SSc. È stata indagata la sua efficacia soprattutto come terapia di mantenimento in alternativa alla AZA. Per quanto riguarda invece il suo profilo di sicurezza, risulta essere un farmaco sicuro e ben tollerato. Gli effetti indesiderati più frequenti sono rappresentati dai disturbi gastrointestinali, che sono però spesso risolvibili con la sola riduzione del dosaggio. Per quanto riguarda la sicurezza in regimi di lunga durata la larga esperienza sui trapianti è confortante.

Liopsis et al. (73) pubblicò uno studio prospettico su 5 pazienti con alveolite di recente insorgenza trattati con 2000mg/die di MMF che già dopo i primi 4-6 mesi di terapia mostravano un miglioramento della sintomatologia restrittiva respiratoria nonché una diminuzione se non scomparsa degli aspetti ground glass alla HRCT, aumento statisticamente significativo del DLCO e miglioramento del FVC. Lo studio di Gerbino e collaboratori (74) invece mostrò un aumento significativo del VC, ma non del DLCO, nella sua coorte di 13 pazienti trattati per 12 mesi. Gli stessi autori sottolineavano come la selezione di pazienti con malattia polmonare di recente insorgenza, con evidenza di ground glass o di opacità reticolari all'HRCT e con recente peggioramento della funzionalità polmonare, avesse contribuito al successo della terapia. Questo costituisce

un'ulteriore evidenza di come sia importante cogliere l'interstiziopatia nel suo stadio più precoce al fine di ottenere una migliore risposta alla terapia. Zamora et al. (75) indagarono retrospettivamente 17 pazienti concludendo che 12 o 24 mesi di MMF come terapia di prima linea stabilizzano la funzionalità polmonare, rallentando la progressione dell'interstiziopatia. Lo stesso effetto di preservare dal deterioramento della funzione polmonare è stato osservato in 28 pazienti affetti da ILD in contesto di malattia del tessuto connettivo (9 sclerodermie, 5 dermatopolimiositi, 5 UCTD). Questo studio ha confermato la sicurezza e la buona tolleranza del farmaco (76).

Uno dei limiti di questi studi è rappresentato dal limitato numero di pazienti inclusi. Uno studio di maggiori dimensioni è stato condotto da Nihtyanova e collaboratori al Royal Free Hospital nel Regno Unito. Si trattava di uno studio retrospettivo su 109 pazienti trattati con MMF e 63 controlli trattati con altri immunosoppressori, seguiti per 5 anni. Lo studio non si limitava alla valutazione della funzionalità respiratoria. L'indicazione principale all'immunosoppressione era rappresentato dall'estendersi rapido delle lesioni cutanee o dall'interstiziopatia polmonare. Nel gruppo trattato con MMF si notava nei 5 anni una minore frequenza di evoluzione in fibrosi polmonare rispetto all'altro gruppo ($p=0,037$), anche se non si evidenziava un significativo aumento del FVC. Gli autori concludevano affermando la buona tollerabilità del farmaco e giudicandolo almeno parimenti efficace alle altre terapie correnti della sclerosi sistemica (77). Yilmaz. N e collaboratori hanno valutato retrospettivamente 12 pazienti trattati con MMF dopo risposta inadeguata all'induzione con CYC. A 2 aa gli score delle prove funzionali polmonari e gli score HRCT sembravano stabilizzarsi.

Fischer et al hanno analizzato una coorte diversificata 125 soggetti con ILD associata a malattie del connettivo trattati con MMF. Tale farmaco risultava esser ben tollerato migliorando significativamente l'FVC e il DLCO. Tra i pazienti trattati con MMF trovavano inoltre una differenza statisticamente significativa dei parametri clinici presi in considerazione tra i pazienti con pattern da polmonite interstiziale usuale (UIP), rispetto a quelli con pattern NSIP (69).

Cappelli S. et al in una recente revisione della letteratura definisce farmaci "ancora" la CYC e l'AZA mentre per il MMF ritiene si necessiti di ulteriori studi per stabilirne la reale efficacia, considerandolo come farmaco alternativo alla CYC qualora quest'ultima non sia tollerata. (79). Nella metanalisi di Tan A si suggerisce che MMF è una terapia

sicura e che porta ad una stabilizzazione dei parametri funzionali nei pazienti con SSc-ILD). Non sono ancora disponibili trials randomizzati e controllati su larga scala.

Altre terapie

Rituximab

Il rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico umano/murino già impiegato in ambito oncologico che ha trovato una sua applicazione anche in reumatologia, specie nell'AR, nel LES e nella granulomatosi di Wegener. Recentemente è stata descritta in 3 case report la sua efficacia anche nel trattamento della ILD-SSc che non aveva precedentemente risposto al cortisone e alla CYC (81, 82, 83). Lo studio di Daoussis et al. mostra risultati incoraggianti sia sulla funzionalità respiratoria che sulla fibrosi cutanea in pazienti con severa ILD (84). Non sono stati ancora condotti trial clinici randomizzati controllati. Questo anticorpo monoclonale è rivolto contro il CD 20, antigene di superficie dei linfociti B nelle varie fasi di maturazione, eccetto le fasi estreme di staminali e plasmacellule. Il suo meccanismo d'azione prevede tre vie: la lisi cellulare complemento-mediata, la citotossicità cellulare anticorpo-mediata e l'induzione di apoptosi delle cellule CD20 positive. Il risultato è la deplezione di linfociti B periferici. Considerando il ruolo del sistema immunitario nella patogenesi della SSc e in particolare l'evidenza di elevati livelli di cellule B nei polmoni dei pazienti con SSc-ILD, appare chiaro che l'immunoterapia rivolta contro le cellule B può rappresentare un'opzione plausibile.

Imatinib

Imatinib è un inibitore della tirosin chinasi, enzima implicato nella via di signaling intracellulare del TGF β . Il TGF β è una citochina che promuove la proliferazione dei fibroblasti, stimola la sintesi di collagene e di matrice extracellulare. È chiaro quindi come questa citochina rappresenti un interessante target per una nuova terapia per la SSc. Effettivamente nei modelli animali di Ssc e fibrosi polmonare ha mostrato risultati promettenti, ma applicato all'uomo si è presentato piuttosto mal tollerato. L'analisi ad interim di uno studio open-label in un singolo centro su 30 pazienti affetti dalla forma cutanea diffusa la somministrazione di 400 mg al giorno di imatinib ha dimostrato miglioramento clinico e istologico della durezza cutanea e un miglioramento della funzionalità respiratoria (aumento FVC da 84 \pm 22 a 90 \pm 23%, aumento DLCO da 80 \pm 21

a $88\pm 27\%$). Da notare come 14 pazienti abbiano abbandonato anzitempo lo studio per l'insorgenza di importanti effetti indesiderati, come ritenzione idrica, nausea, astenia e aumento della CK (85). Altre molecole inibitrici della tirosin kinasi sono in fase di studio.

Il trapianto autologo di cellule staminali

La terapia immunoablattiva seguita dal trapianto autologo di cellule staminali è stata proposta per svariate patologie autoimmuni refrattarie alla terapia convenzionale. È stata invocata la sua applicazione anche alle forme più severe di SSc. In effetti nello studio di Tyndall (86) condotto su 55 pazienti sclerodermici il trapianto si è dimostrato molto efficace nel ridurre il grado del coinvolgimento cutaneo, ma la procedura era gravata da una non trascurabile mortalità. Non è a tutt'oggi chiaro se possa avere un'applicazione sulle complicanze letali, quali la ILD e la PAH. Anzi un'interstiziopatia severa rappresenterebbe una controindicazione al trapianto di cellule staminali.

Trapianto polmonare

Il trapianto di polmone è l'ultima speranza per i pazienti con interstiziopatia progressiva e severa che non risponde alla terapia farmacologica. Da uno studio retrospettivo comprendente l'intervallo di tempo compreso tra il 1987 e il 2004 su 47 pazienti sclerodermici sottoposti a trapianto polmonare è emerso che la mortalità e la morbilità sono paragonabili a quelle dei trapiantati per altri motivi. Il 15% è deceduto entro i primi 30 giorni, il 32% più tardi. Le cause dei decessi dopo i primi 30 giorni dal trapianto sono state: le infezioni, l'insufficienza respiratoria, il cancro, e l'ipertensione polmonare. Il tasso di sopravvivenza a 1 e a 3 anni è stato pari a 68 e 46%, risultati sovrapponibili a quelli ottenuti da pazienti trapiantati per altri motivi (87).

SCOPO DEL LAVORO

La sclerosi sistemica (SSc) è una connettivite caratterizzata da molteplici impegni viscerali, che ne condizionano la prognosi. Uno dei più frequenti e gravi è l'interstiziopatia polmonare (ILD) che costituisce la principale causa di morte in questa malattia.

La fibrosi, che ne costituisce la manifestazione finale ed irreversibile, è preceduta ed accompagnata da una alveolite ancora suscettibile al trattamento. Ciò è stato evidenziato in un primo tempo mediante studi biotici in toracotomia (36) e negli ultimi anni è stato confermato anche da metodiche meno invasive quali il broncolavaggio alveolare e la biopsia tramite broncoscopia e da metodiche per niente invasive, ma molto specifiche, quali la TC ad alta risoluzione, che consente di distinguere le lesioni fibrotiche da quelle alveolitiche(44).

Negli ultimi anni sono stati effettuati numerosi studi per dimostrare l'efficacia di farmaci immunosoppressori come terapia della ILD. Sono stati utilizzati soprattutto la ciclofosfamide (CYC) l'azatioprina (AZA) e il micofenolato mofetile (MMF).

Anche i pazienti affetti da SSc complicata da ILD afferenti all'U.O.C. di Reumatologia del complesso Azienda Ospedaliera-Università di Padova sono stati trattati negli ultimi anni prevalentemente con questi farmaci.

Scopo della tesi è stato quello di valutare la terapia con MMF utilizzato come farmaco di prima linea in 18 pazienti sclerodermici con ILD, somministrata per un lungo periodo. Gli effetti della terapia sono stati valutati dopo 12 e 24 mesi mediante i parametri di funzionalità respiratoria, la TC polmonare ad alta risoluzione e la determinazione della classe funzionale NYHA.

I risultati sono stati confrontati con quelli osservati in un gruppo storico di pazienti sclerodermici trattati sequenzialmente con CYC ed AZA.

E' stato anche confrontato il profilo di sicurezza dei farmaci impiegati, attraverso una valutazione degli effetti indesiderati.

MATERIALI E METODI

CASISTICA

Nell'Unità operativa complessa di Reumatologia dell' Azienda Ospedaliera-Università di Padova sono stati osservati dal 1982 oltre 700 pazienti affetti da SSc in base ai criteri classificativi dell'American Rheumatology Association (ARA) del 1980 (18). Di essi circa 400 sono tuttora seguiti con regolare follow-up.

Abbiamo selezionato i pazienti sclerodermici che tra il 2010 e il 2014 sono stati trattati con MMF come farmaco di prima linea per l'ILD, complicanza molto frequente della malattia.

Questi pazienti (gruppo 1) sono stati messi a confronto con un gruppo storico di 15 paziente da noi trattati prima del 2010, che avevano assunto la terapia standard per la ILD che prevedeva CYC per os per un anno e successivamente AZA come terapia di mantenimento (gruppo 2).

I pazienti del gruppo 1 sono stati seguiti con regolare follow up ambulatoriale. I dati dei pazienti del gruppo 2 sono stati ricavati dalla revisione retrospettiva della loro documentazione clinica.

CRITERI DI INCLUSIONE ALLO STUDIO

Lo studio ha coinvolto 33 pazienti con diagnosi di sclerodermia secondo i criteri classificativi ARA del 1980, affetti da SSc complicata da interstiziopatia polmonare (ILD) documentata dalla TC del torace ad alta risoluzione (HRCT).

Abbiamo considerato come baseline il momento in cui il paziente aveva iniziato la terapia immunosoppressiva con MMF o con CYC.

I criteri d'inclusione al baseline dovevano essere:

- una classe NYHA uguale o maggiore a 1
- uno score HRCT: di almeno 2
- DLCO inferiore a 65% alle prove spirometriche

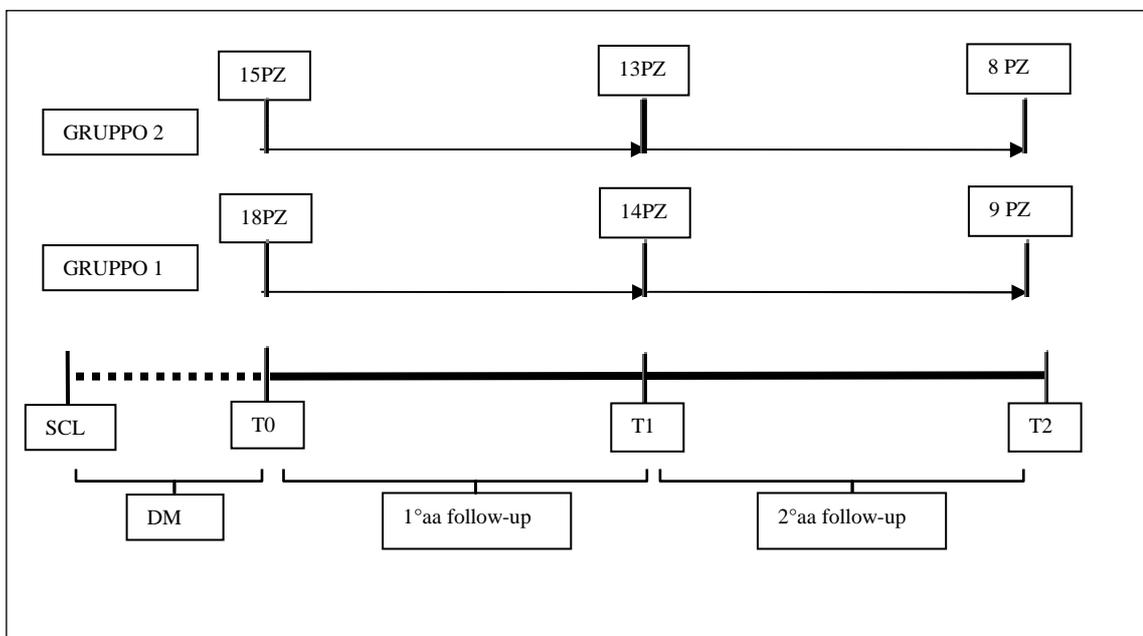
CRITERI DI ESCLUSIONE ALLO STUDIO

Non sono stati ammessi alla terapia immunosoppressiva pazienti sclerodermici con ILD in fase avanzata (FVC < 50%; score 4 all'HRCT, 4° classe funzionale NYHA). Sono stati anche esclusi dallo studio i pazienti che avevano assunto in precedenza altri farmaci immunosoppressori per il controllo della sclerodermia e delle sue complicanze, nonché farmaci per la terapia per l'ipertensione arteriosa polmonare. Non sono stati considerati criteri d'esclusione la terapia con vasodilatatori periferici con meccanismo calcio antagonista, gli antiaggreganti piastrinici, lo steroide a basso dosaggio (prednisone al dosaggio massimo di 12.5 mg/die) e l'iloprost per via infusiva.

DISEGNO DELLO STUDIO

Come parametri di valutazione sono stati considerati la classe funzionale NYHA, per la funzionalità respiratoria, sono stati valutati i parametri della capacità vitale forzata (FVC) e della diffusione alveolo-capillare del monossido di carbonio (DLCO), infine lo score HRCT.

Scopo dello studio è stata la valutazione dell'andamento dei suddetti parametri dopo 12 mesi (T1) e dopo 24 mesi (T2) rispetto al baseline (T0).



Il profilo di sicurezza del MMF e degli altri farmaci immunosoppressori è stato analizzato valutandone gli effetti indesiderati.

Per evento avverso, sono stati considerati gli effetti collaterali che hanno portato alla sospensione del farmaco.

Protocollo terapeutico

I pazienti del gruppo 1 hanno iniziato la terapia con MMF alla dose di 1 gr/die (1x2 cp da 500 mg) passando dopo un mese a 2 gr/die (2x2 cp/die); quando gli esami bioumorali di controllo lo consentivano il dosaggio è stato aumentato a 3 gr/die dopo 3 mesi.

I pazienti del gruppo 2 sono stati trattati con CYC per os alla dose media di 100 mg/die per un anno; successivamente sono passati alla terapia con AZA per os pure alla dose media di 100 mg/die.

Follow up

Il follow-up dei pazienti prevedeva una visita ambulatoriale di controllo ogni 4 mesi. In tale occasione veniva effettuata una valutazione della dispnea che consentiva di definire la classe NYHA, venivano raccolte informazioni su eventuali effetti collaterali della terapia e venivano controllati gli esami bioumorali volti ad evidenziare segni di tossicità epatica, renale o ematologica del farmaco. Il follow up prevedeva anche un controllo semestrale delle prove spirometriche e annuale dell'HRCT.

PARAMETRI DI VALUTAZIONE

La classe funzionale NYHA

Classe I	Pazienti senza limitazione dell'attività fisica. L'attività fisica ordinaria non causa dispnea o affaticamento, dolore toracico o lipotimia/sincope.
Classe II	Pazienti con lieve limitazione dell'attività fisica. Asintomatici a riposo; l'attività fisica ordinaria causa dispnea, dolore toracico o sincope.
Classe III	Pazienti con marcata limitazione dell'attività fisica. Sono asintomatici a riposo; l'attività fisica minima causa dispnea o affaticamento, dolore toracico o lipotimia/sincope.
Classe IV	Pazienti non in grado di eseguire qualsiasi attività fisica senza sintomi. Dispnea e/o affaticamento possono essere presenti anche a riposo. La sintomatologia è aumentata da qualsiasi attività fisica.

I test spirometrici

Venivano ripetuti ogni 6 mesi e comprendevano la spirometria globale, con misurazione dei volumi polmonari statici e dinamici e il test di diffusione del monossido di carbonio, tramite metodica single-breath, che prevedeva un'apnea di dieci secondi (tempo

necessario alla diffusione del gas attraverso la membrana alveolo-capillare). E' stata considerata la percentuale tra il valore osservato e quello teorico predetto.

Per i parametri di funzionalità polmonare sono state considerate significative variazioni superiori al 10% rispetto al baseline nelle valutazioni effettuate al T1 e al T2.

La TC polmonare ad alta risoluzione

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a TC polmonare ad alta risoluzione (HRCT), alcuni presso l'U.O di Radiologia dell'Istituto Oncologico Veneto (IOV), altri sono stati eseguiti in altre strutture radiologiche, ma rivalutati sempre dallo stesso Medico Radiologo Toracico. Per tale motivo non vi è omogeneità di apparecchiature, ma tutti gli esami sono stati eseguiti secondo una procedura ampiamente validata, sia con tecnica tradizionale che con acquisizione volumetrica. Le immagini sono state osservate con finestra sia per parenchima polmonare che per mediastino su supporti elettronici (CD, PACS).

La HRCT, prendeva in considerazione le seguenti lesioni: opacità "a vetro smerigliato" (aree di aumentata densità del parenchima polmonare, nella quale i bronchi ed i vasi rimangono evidenti"), irregolarità dell'interfaccia tra pleura parietale e viscerale, linee settali (ispessimenti dei setti interlobulari), linee sub pleuriche, aree "a favo d'ape" (spazi cistici di 6-10 mm di diametro con ispessimento delle pareti).

Per la valutazione della HRCT è stato utilizzato uno score semplificato da 1 a 4, articolato nel modo seguente:

SCORE HRCT	
Score 1	assenza di alterazioni significative di ILD;
Score 2	prevalenza di opacità a vetro smerigliato;
Score 3	prevalenza di aspetti fibrotici (linee settali, subpleuriche, ecc.);
Score 4	aspetti fibrotici anche con aree a favo d'ape.

ANALISI STATISTICA

Tutti i casi sono stati codificati e categorizzati in formato Excel.

Le variabili continue sono state raggruppate nelle categorie del disegno dello studio ed espresse come valore medio \pm deviazione standard (DS). Le differenze tra i gruppi sono state valutate con il test T di Student per la distribuzione normale delle variabili e con il Wilcoxon signed rank test.

Tutte le analisi sono state eseguite con il programma statistico SPSS.

RISULTATI

Il gruppo 1 includeva 18 pazienti che avevano assunto MMF come immunosoppressore di prima linea ed il gruppo 2 includeva 15 pazienti che avevano assunto la terapia standard con CYF per os per 1 anno e poi trattati con AZA come terapia di mantenimento.

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI AL BASELINE

I principali dati demografici non differivano tra i due gruppi di trattamento (Tabella I). Il gruppo 1 era caratterizzato da 14 donne e 4 uomini, che al momento in cui intraprendevano la terapia immunosoppressiva, avevano un'età compresa tra 35 e 73 anni (media 57 ± 12.1) e una durata di malattia variabile da anni 1 a 6 (media 3.9 ± 4.5). 2 pazienti presentavano la forma cutanea limitata di malattia, 16 la forma diffusa. Tutti i pazienti presentavano la positività degli anticorpi antinucleo (ANA), in 13 casi (72.2%) con specificità anti-topoisomerasi I (Scl-70), in 2 casi (11.1%) anti RNA polimerasi III, l'anticentromero non era espresso da nessun paziente, mentre 3 (16.7%) avevano positività per gli ANA ma senza specificità.

Il gruppo 2 era caratterizzato da 12 donne e 3 uomini, che al momento in cui intraprendevano la terapia immunosoppressiva, avevano un'età compresa tra 29 e 72 anni (media 49.6 ± 12.73) e una durata di malattia variabile da anni 1 a 19 (media 5.47 ± 4.72). 4 pazienti presentavano la forma cutanea limitata di malattia, 11 la forma diffusa. Tutti i pazienti presentavano la positività degli anticorpi antinucleo (ANA), in 11 casi (73%) con specificità anti-topoisomerasi I (Scl-70), in 1 caso (7%) anti RNA polimerasi III, l'anticentromero non era espresso da nessun paziente, mentre 3 (20%) avevano positività per gli ANA ma senza specificità.

TABELLA I: Confronto delle caratteristiche demografiche e cliniche medie del gruppo 1 e 2		
	GRUPPO 1	GRUPPO 2
Sesso F/M	14/4	12/3
Età (aa) all'inizio della terapia	57 ±12.1	49.6±12.7
DM (aa) all'inizio della terapia	3.9± 4.5	5.4 ± 4.7
Forma cutanea limitata/diffusa	2/16	4/11
Anti Scl 70	13 (72.2%)	11 (73%)
Anti RNA pol III	2 (11.1%)	1 (7%)
Anti centromero	0	0
ANA aspecifici	3 (16.7%)	3 (20%)

*DM= durata di malattia; FC= forma cutanea; D= forma diffusa; L= forma limitata;
Scl70=antitopoisomerasi I; RNA III= antiRNA polimerasi III; ACA= anticentromero; ANA=anticorpi
anti nucleo senza specificità*

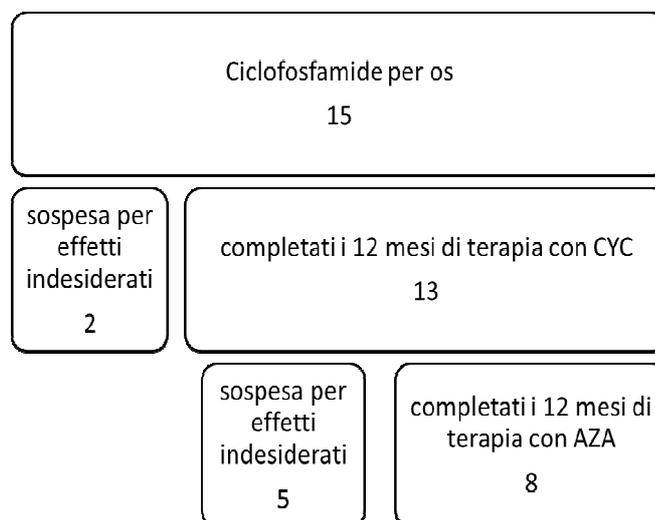
FOLLOW UP DELLO STUDIO

Dei 18 pazienti del gruppo 1 arruolati al baseline (T0), dopo un anno (T1) 14 erano ancora in terapia; 2 hanno sospeso il MMF per il peggioramento del quadro clinico; mentre i restanti 2 erano stati arruolati da meno di un anno.

Dei 14 pazienti ancora in studio al T1 9 hanno raggiunto un follow-up di 2 anni mentre gli altri devono ancora raggiungere il T2.



Il gruppo 2 era composto da 15 pazienti dei quali 13 avevano completato i primi 12 mesi di trattamento; 2 pazienti l'avevano sospeso per leucopenia. A 24 mesi in 8 erano ancora in terapia con AZA; 3 erano usciti dallo studio per leucopenia e 2 per epatotossicità.



CLASSE FUNZIONALE NYHA

Nel gruppo 1 nessun paziente ha peggiorato la classe funzionale né al T1 né al T2. Al T1 4 pazienti su 14 sono passati dalla classe 2 alla 1. Dei 9 pazienti che hanno raggiunto il T2, 1 è passato dalla 2° alla 1° classe, i restanti pazienti hanno mantenuto la classe 2°.

Del gruppo 2 nessuno è peggiorato nella classe funzionale. Dei 13 pazienti che hanno raggiunto il T1, 3 sono passati dalla classe 2 alla 1. Degli 8 pazienti che hanno raggiunto il T2, 2 hanno migliorato la classe funzionale.

Dall'analisi statistica non sono emerse differenze statisticamente significative.

Le percentuali delle classi funzionali NYHA dei due gruppi al baseline, dopo 12 e 24 mesi di terapia rilevate nei 2 gruppi di pazienti sono riportati nelle tabelle 2 e 3.

Tabella 2: valori percentuali della classe funzionale NYHA al T0, T1, T2			
GRUPPO 1			
Classe NYHA	T0	T1	T2
1	0,0%	28,6%	11,1%
2	88,9%	64,3%	77,8%
3	11,1%	7,1%	11,1%
4	0,0%	0,0%	0,0%

Tabella 3: valori percentuali della classe funzionale NYHA al T0, T1, T2			
GRUPPO2			
Classe NYHA	T0	T1	T2
1	0,00%	23,08%	25,00%
2	73,33%	53,85%	50,00%
3	26,67%	23,08%	25,00%
4	0,00%	0,00%	0,00%

TEST SPIROMETRICI

Nel gruppo 1 i valori di FVC a 12 mesi erano migliorati in 5 pazienti, stabilizzati in 8 e peggiorati solo in un paziente; a 24 mesi erano migliorati in 3, stabilizzati in 5 e peggiorati in 1 paziente.

Nel gruppo 2 i valori di FVC a 12 mesi erano migliorati 2 pazienti, stabilizzati 9 e peggiorati in 2; a 24 mesi erano migliorati in 2 e stabilizzati nei restanti 6 pazienti, nessuno era peggiorato.

Per quanto riguarda la diffusione del CO, nel gruppo 1, a 12 mesi, erano migliorati 5 pazienti, stabilizzati 6 e peggiorati 3; a 24 mesi miglioravano 2 pazienti, si stabilizzavano 5 e 2 peggioravano. Nel gruppo 2, al T1, miglioravano in 2, si stabilizzavano in 6 e peggioravano in 5; a 24 mesi migliorava solo un paziente, si stabilizzavano 3 e peggioravano 4.

I valori di FVC (% rispetto al teorico) e DLCO (% rispetto al teorico) al baseline, dopo 12 e 24 mesi di terapia rilevati sono rappresentati nei grafici 1 -4.

Grafico 1: Valori di DLCO (% rispetto al teorico) al T0, T1 e T2 del gruppo 1.

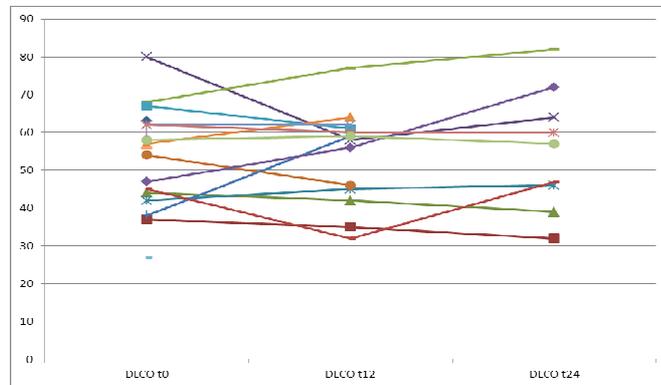


Grafico 2: Valori di FVC (% rispetto al teorico) al T0, T1 e T2 del gruppo 1.

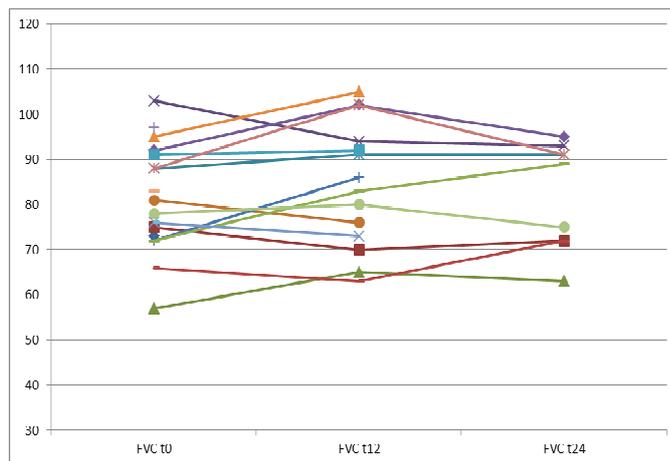


Grafico 3: I valori di DLCO (% rispetto al teorico) al T0, T1 e T2 del gruppo 2.

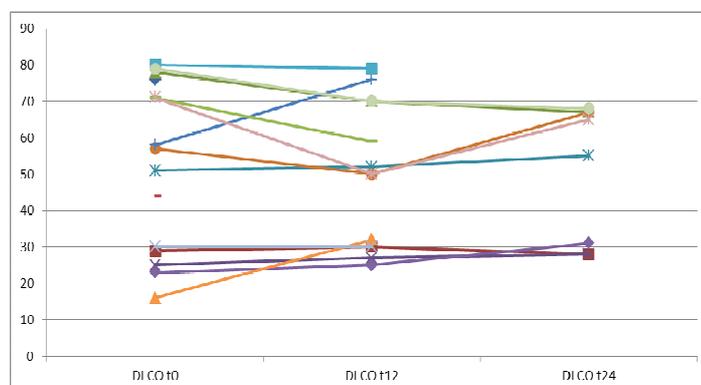
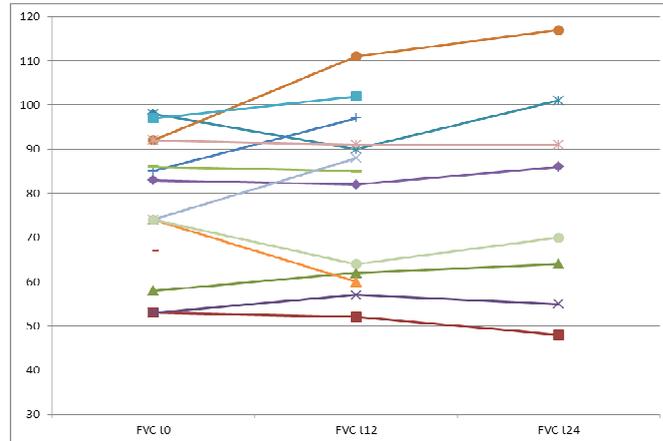


Grafico 4: I valori di FVC (% rispetto al teorico) al T0, T1 e T2 del gruppo 2.



Il confronto tra i valori medi di FVC (% rispetto al teorico) e DLCO (% rispetto al teorico) al baseline, dopo 12 e 24 mesi di terapia rilevati nei 2 gruppi di pazienti sono riportati nelle tabelle 4 e 5.

Per entrambi i parametri respiratori non sono state rilevate sui valori medi variazioni significative all'interno dei 2 gruppi.

Tabella 4: confronto del FVC al T0, T1, T2 tra il gruppo 1 e 2		
	GRUPPO 1	GRUPPO 2
FVC T0	81,32±11,80	78,93±15,80
FVC T1	84,43±13,92	80,08±19,02
FVC T2	82,33±11,83	79,00±23,80

Tabella 5: confronto del DLCO al T0, T1, T2 tra il gruppo 1 e 2		
	GRUPPO 1	GRUPPO 2
DLCO T0	53,72±13,24	52,53±23,13
DLCO T1	54,03±12,32	50,00±19,75
DLCO T2	55,44±16,01	51,13±18,79

HRCT

Nel gruppo 1, a 12 mesi, 3 pazienti miglioravano lo score, passando dalla classe 2 alla 1; 10 pazienti si stabilizzavano, di questi uno era allo score 3 gli altri hanno mantenuto lo score 2, solo un paziente è passato dal punteggio score di 2 a 3 per poi tornare al 2 al T2. A 24 mesi, 3 sono migliorati passando dallo score 2 al 1, 6 si sono stabilizzati e nessuno è peggiorato.

Nel gruppo 2 a 12 mesi, 2 pazienti miglioravano lo score (passando dalla classe 2 alla 1), 9 stabilizzavano le lesioni alla TC e 2 peggioravano, passano uno da 3 a 4 e l'altro da 2 a 3. A 24 mesi, 2 pazienti miglioravano, 5 si stabilizzavano e 1 manteneva la progressione di score da 2 a 3 avvenuta al T1.

I valori percentuali dello score HRCT del gruppo 1 e 2 sono riportati qui di seguito nelle tabelle 6 e 7.

Tabella 6: valori percentuali degli score HRCT al T0, T1, T2			
GRUPPO 1			
Score	T0	T1	T2
1	0,00%	21,41%	33,32%
2	88,90%	64,32%	55,61%
3	11,11%	14,31%	11,10%
4	0,00%	0,00%	0,00%

Tabella 7: valori percentuali degli score HRCT al T0, T1, T2			
GRUPPO2			
Score	T0	T1	T2
1	0,00%	23,08%	25,00%
2	73,33%	53,85%	50,00%
3	26,67%	23,08%	25,00%
4	0,00%	0,00%	0,00%

EFFETTI AVVERSI

Vengono riportati solo gli effetti collaterali di rilevanza tale da aver determinato l'uscita dallo studio.

Nei pazienti in terapia con MMF non sono stati riportati effetti indesiderati gravi.

Nel gruppo di confronto dei 15 pazienti che hanno assunto CYF per os, 2 hanno manifestato leucopenia di entità tale da dover sospendere il trattamento.

Fra pazienti trattati con AZA, 5 hanno sospeso anzitempo la terapia, 3 per leucopenia, 2 per epatotossicità.

I due gruppi sono stati confrontati utilizzando il chi-quadrato ottenendo un valore di 8,052 con $P = 0,0046$.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'interstiziopatia polmonare (ILD) rappresenta il più frequente e severo impegno d'organo in corso di sclerosi sistemica (SSc) e ne condiziona negativamente la prognosi, rappresentando la principale causa di morte SSc-correlata (25). Affinché la terapia della ILD si dimostri utile, è fondamentale che i pazienti vengano trattati precocemente, in quanto l'obiettivo principale è quello di bloccare o comunque di rallentare il processo infiammatorio alveolitico che sta alla base dell'interstiziopatia stessa e che innesca poi le lesioni fibrotiche irreversibili.

La terapia dell'ILD rimane una questione ancora oggetto di discussione. Gli insuccessi del cortisone hanno portato negli ultimi anni a utilizzare diversi farmaci immunosoppressori non selettivi.

Il MMF è largamente usato per prevenire il rigetto di trapianto, mentre in ambito reumatologico è usato principalmente nel LES. È entrato più recentemente a far parte delle opportunità terapeutiche della ILD-SSc in quanto si è dimostrato avere anche un effetto antifibrotico. (71)

Gli ultimi anni infatti, hanno visto la pubblicazione diversi studi che si proponevano di valutare l'efficacia e la tossicità del MMF nell'ILD-SSc e che concludevano con risultati incoraggianti per il controllo della malattia interstiziale polmonare e con un buon profilo di tolleranza terapeutica; si trattava però di studi di piccole dimensioni.

Come emerge da una consensus conference del 2012 i farmaci immunosoppressori più comunemente utilizzati per la terapia dell'ILD sono la CYC, l'AZA e il MMF (56).

Recentemente alcuni studi retrospettivi hanno indagato il MMF con farmaco di prima linea.

Lioysis et al. (73) ha pubblicato uno studio prospettico su 5 pazienti con alveolite di recente insorgenza trattati con 2000mg/die di MMF che già dopo i primi 4-6 mesi di terapia mostravano miglioramento della sintomatologia restrittiva respiratoria nonché diminuzione, se non scomparsa, degli aspetti ground glass alla HRCT, inoltre riscontravano un aumento statisticamente significativo del DLCO e un miglioramento del FVC.

Zamora et al. (75) hanno indagato retrospettivamente 17 pazienti, concludendo che 12 o 24 mesi di MMF come terapia di prima linea stabilizzano la funzionalità polmonare, rallentando la progressione dell'interstiziopatia.

Per contro, Panopoulos ST et al, hanno confrontato un gruppo di pazienti trattati in prima linea con CYC e un altro con MMF. A 2 anni videro una stabilizzazione dei valori spirometrici ma un peggioramento dello score HRCT nei pazienti trattati con MMF rispetto a quelli trattati con CYC (88).

Il nostro studio osservazionale si è proposto di dare un ulteriore contributo alla valutazione degli effetti dell'MMF somministrato come terapia di prima linea sull'evoluzione della ILD.

Nonostante la numerosità limitata della casistica il periodo di trattamento dei pazienti studiati appare lungo. Si è confrontato il MMF come farmaco di prima linea con la terapia convenzionale che utilizzava rispettivamente CYF e AZA in un gruppo di pazienti precedentemente trattato.

Lo studio si è proposto anche di valutare il profilo di sicurezza di questo farmaco in pazienti comunque trattati con una politerapia, vista la complessità delle manifestazioni cliniche nella SSc.

Al momento del baseline non vi erano differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda i parametri demografici e gli indici clinici presi in considerazione.

La terapia con MMF ha comportato un miglioramento in alcuni casi e in generale la stabilizzazione della classe funzionale NYHA, dello score HRCT ed un lieve miglioramento dell'FVC e del DLCO dopo 12 mesi di terapia che si è mantenuto dopo 24 mesi.

Nel gruppo di confronto, trattato con CYC e AZA, le modificazioni della classe NYHA e dello score HRCT sono risultate sovrapponibili a quelle osservate nei pazienti trattati con MMF. Per quanto concerne le prove spirometriche la FVC è rimasta invariata e la DLCO si è lievemente ridotta nelle valutazioni al T1 e al T2. Non sono emerse differenze statisticamente significative confrontando i 2 gruppi trattati con farmaci immunosoppressori diversi.

In definitiva, sia la terapia con MMF sia quella sequenziale con CYC e AZA hanno portato ad una stabilizzazione del quadro clinico della ILD, che ha consentito di mantenere il dosaggio del cortisone a livelli inferiori a 12.5 mg di prednisone/ die.

Tenuto conto dell'evoluitività della ILD nei pazienti sclerodermici, questo risultato appare buono. Ovviamente il confronto con un gruppo storico di pazienti non trattati con farmaci immunosoppressivi sarebbe ulteriormente apportato significatività ma va tenuto conto che fino ad una quindicina di anni fa non avevamo a disposizione l'HRCT per la diagnosi e il follow up dell'ILD.

Si conferma inoltre il fatto che quando la terapia immunosoppressiva viene somministrata a pazienti con fasi più precoci di ILD i risultati sono migliori.

Nel gruppo trattato con MMF nessun paziente ha riportato eventi avversi tali da determinare la sospensione della terapia e quindi l'uscita dallo studio, invece 7 pazienti del gruppo di confronto (46.7%) hanno dovuto sospendere la terapia immunosoppressiva, in 5 casi per leucopenia marcata (2 da CYC e 3 da AZA e in 2 casi per epatotossicità (entrambi da AZA). Va inoltre sottolineato che 12 mesi di terapia con CYC alla dose media quotidiana di 100 mg comportano una dose globale di farmaco somministrata di 36,5 gr, con un rischio abbastanza elevato di indurre neoplasie (89).

La differenza fra gli eventi avversi tra i 2 gruppi di pazienti è risultata statisticamente significativa a favore dell'MMF ($p=0.0045$). Il profilo di sicurezza del farmaco appare quindi migliore rispetto a quello dei due immunosoppressori somministrati nel gruppo di confronto.

Il buon profilo di tolleranza e i risultati incoraggianti sui parametri clinici, funzionali e strumentali della ILD ci inducono a continuare ad utilizzare il MMF come terapia di prima scelta del trattamento dell'ILD associata alla SSc, anche alla luce di quanto riportato da alcuni studi clinici che hanno dimostrato gli effetti favorevoli dell'MMF anche sull'estensione delle lesioni cutanee nella forma diffusa di sclerodermia, quella maggiormente colpita dalla ILD (90).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Leroy EC, Black C, Fleischmajer R et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.* 1988 15: 202.
- 2) Cozzi F. Sclerosi sistemica (sclerodermia) in *Malattie Reumatiche*. Eds, McGraw-Hill. Publ Milano 2002 pag 242-252
- 3) Chiffot H, Fautrel B, Sordet C, et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2008 37: 223-35.
- 4) Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24: 165-170.
- 5) Rittner G, Schzanitz G, Baur MP, et al. Family studies in scleroderma demonstrating an HLA-linked increased chromosomal breakage rate in cultured lymphocytes. *Hum Genet* 1988 81:64-70.
- 6) Rocco VK, Hurd ER. Scleroderma and scleroderma-like disorders. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 1986 16: 22-69.
- 7) Hunzelmann N, Brinckmann J. What are the new milestones in the pathogenesis of systemic sclerosis? *Ann Rheum Dis.* 2010 69 Suppl. 1:152-56.
- 8) Ferri C, Valentini G, Cozzi F, et al. Systemic Sclerosis Study Group of the Italian Society of Rheumatology (SIR-GSSSc). Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore).* 2002 81(2):139-53.
- 9) Catoggio LJ, Bernstein RM, Black CM, et al. Serological markers in progressive systemic sclerosis: Clinical correlacions. *Ann Rheum Dis.* 1983 42:23-7.

- 10) Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, et al. Systemic sclerosis sine scleroderma: Demographic, clinical, and serologic features and survival in 48 patients. *Arthritis Rheum.* 2000 43: 444-451.
- 11) Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, et al. The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology (Oxford).* 2008 47 :1185-92.
- 12) Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2005 35:35-42
- 13) Ferri C, Bernini L, Cecchetti R, et al. Cutaneous and Serological subset of systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1991 18: 1826-32
- 14) Steen VD, Conte C, Owens GR, et al. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum .*1994 37: 1283-89.
- 15) Follansbee WP. The cardiovascular manifestations of systemic sclerosis (scleroderma). *Curr Probl Cardiol.* 1986 11: 241-98
- 16) Steen VD, Medsger TA Jr. Long-term outcomes of scleroderma renal crisis. *Ann Intern Med.* 2000 133: 600-3.
- 17) Giordano M, Valentini G, Migliaresi S, et al. Different anti-body patterns and different prognosis in patients with scleroderma with various extent of skin sclerosis. *J Rheumatol.* 1986 13: 911.
- 18) Masi AT et al.: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association. Diagnostic and therapeutic criteria committee. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
- 19) Le Roy C., Medsger Jr. Criteria for classificatio of Early Systemic Sclerosis. *J Rheumatol.* 2001 28:1573-6
- 20) Matucci-Cerinic M, Allanore Y, Czirják L et al. The challenge of early systemic sclerosis for the EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) community. It is time to cut the Gordian knot and develop a prevention or rescue strategy. *Ann Rheum Dis.* 2009Sep;68(9):1377-80.

- 21) Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2013 Nov; 65 (11): 2737-47
- 22) Bryan C, Howard Y, Brennan P, et al. Prediction of five-years survival following presentation with scleroderma: Development of a simple model using three diseases factors at first visit. *Arthritis Rheum.* 1999 42:2660-5.
- 23) Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S, et al. European multi- centre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. II. Identificacion of disease activity variables and development of preliminary activity indexes. *Ann Rheum Dis.* 2001 60:592-8
- 24) Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 940-944.
- 25) Tyndall AJ, Bannert B, Cozzi F, 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 15.
- 26) Avouac J, Kowal-Bielecka O, Landewe R, et al. European League Against Rheumatism (EULAR) Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) recommendations for the treatment of systemic sclerosis: methods of elaboration and results of systematic literature research. *Ann Rheum Dis.* 2009 68: 629-34.
- 27) Kowal-Bielecka O, Landewé R, Avouac J, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis.* 2009 68: 620-8
- 28) Van Laar JM, Nihtyanova SI, Naraghi K et al. Autologous HSCT for systemic sclerosis. *Lancet.* 2013 Jun 15;381(9883):2079-80
- 29) Cozzi F, Marson P. Plasma-exchange in the treatment of systemic rheumatic diseases: past and present experience. *Reumatismo.* 61:161-4.
- 30) Dau PC, Kahaleh MB, Sagebiel RW: Plasmapheresis and immunosuppressive drug therapy in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 1128-36.

- 31) Highland KB. Recent advances in scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Curr Opin Rheumatol*. 2014 Nov;26(6):637-45.
- 32) Hsu VM, Chung L, Hummers LK, et al. Development of pulmonary hypertension in a high-risk population with systemic sclerosis in the Pulmonary Hypertension Assessment and Recognition of Outcomes in Scleroderma (PHAROS) cohort study. *Semin Arthritis Rheum*. 2014 Aug;44(1):55-62.
- 33) F. Cozzi, P. Marson, S. Cardarelli, M. Favaro, T. Tison, M. Tonello, E. Pigatto, G. De Silvestro, L. Punzi, A. Doria. Prognosis of scleroderma renal crisis: a long-term observational study. *Nephrol Dial Transplant* 27: 4398-403; 2012.
- 34) Greidinger EL, Flaherty KT, White B, et al. African-American race and antibodies to topoisomerase I are associated with increased severity of scleroderma lung disease. *Chest* 1998; 114: 801-807
- 35) Morelli S, Barbieri C, Sgreccia A, et al. Relationship between cutaneous and pulmonary involvement in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997; 24: 81-85.
- 36) Harrison NK, Myers AR, Corrin B, et al. Structural features of interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Am Rev Respiratory Disease* 1991; 144: 706-713. Marie I, Dominique S, Levesque H, et al. Esophageal involvement and pulmonary manifestations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2001; 45: 346-354.
- 37) De Souza RB, Borges CT, Capelozzi VL, et al. Centrilobular fibrosis: an underrecognized pattern in systemic sclerosis. *Respiration* 2009; 77: 389-397.
- 38) Steen VD, Graham G, Conte C et al. Isolated diffusing capacity detection in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 765-770.
- 39) Peters-Golden M, Wise RA, Schneider P, et al.: Clinical and demographic predictors of loss pulmonary function in systemic sclerosis. *Medicine* 1984; 63: 221-231.
- 40) Scheja A, Akesson A, Wollmer P, et al.: Early pulmonary disease in systemic sclerosis: a comparison between carbon monoxide transfer factor and static lung compliance. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 725-29.

- 41) Wells AU, Hansell DM, Rubens MB, et al. Fibrosing alveolitis in systemic sclerosis. Indices of function in relation to extent of disease on computed tomography. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1229-36.
- 42) Schurawitzki H, Stiglbauer R, Graninger W, et al. Interstitial lung disease in progressive systemic sclerosis: high-resolution CT versus radiography. *Radiology* 1990; 176: 755-759.
- 43) 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.
- 44) Wells AU, Hansell DM, Corrin B, et al.: High resolution computed tomography as a predictor of lung histology in systemic sclerosis. *Thorax* 1992; 47: 738-42.
- 45) Wells AU, Hansell DM, Rubens MB, et al.: The predictive value of appearances on thin-section computed tomography in fibrosing alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1076-82.
- 46) Wells AU, Rubens MB, du Bois RM, et al.: Serial CT in fibrosing alveolitis: prognostic significance of the initial pattern. *Ann Rheum Dis* 1993; 161: 1159-65.
- 47) Strollo D, Goldin J. Imaging lung disease in systemic sclerosis. *Curr Rheumatology Rep.* 2010; 12: 156-61.
- 48) Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1581-1586.
- 49) Goldstein RA, Rohatgi PK, Bergofsky EH, et al.: American Thoracic Society: clinical role of bronchioalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 481-86.
- 50) Gudbjornsson B, Hollgren R, Nettelbladt O, et al.: Phenotypic and functional activation of alveolar macrophages, T lymphocytes and NK cells in patients with systemic sclerosis and primary Sjogren's Syndrome. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 574-79.

- 51) Silver RM, Miller KS, Kisnella MB, et al. Evaluation and management of scleroderma lung disease using bronchoalveolar lavage. *Am J Med* 1990; 88: 470
- 52) Agostini C, Semenzato GP, Betterle C. Principi di terapia delle malattie autoimmuni. In "Le malattie autoimmuni" 2001 Piccin Editore; pagg 691-707
- 53) Doria A, Punzi L. Elementi di farmacoterapia delle malattie reumatiche. In "Malattie Reumatiche". IV edizione 2007;Mc Graw- Hill Editore; pagg 100-122.
- 54) Steen VD, Medsger TA. Case-control study of corticosteroids and other drugs that either precipitate or protect from the development of scleroderma renal crisis. *Arthritis Rheum* 1998; 4
- 55) Steen VD, Lanz JK,Jr, Conte C, et al. Therapy for severe interstitial lung disease in systemic sclerosis. A retrospective study. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1290-1296. 1: 1613-1619.
- 56) Walker KM, Pope J. and participating members of the Scleroderma Clinical Trials Consortium (SCTC), Canadian Scleroderma Research Group (CSRG). Treatment of systemic sclerosis complications: what to use when first-line treatment fails-a consensus of systemic sclerosis experts. *Semin Arthritis Rheum* 2012; 42: 42-55.
- 57) Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 2655-2666. 81
- 58) Hoyles RK, Ellis RW, Wellsbury J, et al. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of corticosteroids and intravenous cyclophosphamide followed by oral azathioprine for the treatment of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3962-3970
- 59) Nannini C, West CP, Erwin PJ, et al. Effects of cyclophosphamide on pulmonary function in patients with scleroderma and interstitial lung disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and observational prospective cohort studies. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10(5):R124.
- 60) Dheda K, Lalloo UG, Cassim B, et al. Experience with azathioprine in systemic sclerosis associated with interstitial lung disease. *Clin Rheumatol* 2004; 23: 306-309.

- 61) Nadashkevich O, Davis P, Fritzler M, et al. A randomized unblinded trial of cyclophosphamide versus azathioprine in the treatment of systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2006; 25: 205-12.
- 62) Berezne A, Ranque B, Valeyre D, et al. Therapeutic strategy combining intravenous cyclophosphamide followed by oral azathioprine to treat worsening interstitial lung disease associated with systemic sclerosis: a retrospective multicenter open-label study. *J Rheumatol* 2008; 35: 1064-1072.
- 63) BG.Katzung. *Farmacologia generale e clinica*. V edizione, Piccin
- 64) Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000. 47: 85-118.
- 65) Cohn RG, Mirkovich A, Dunlap B, et al. Mycophenolic acid increases apoptosis, lysosomes and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines. *Transplantation* 1999. 68: 411-8
- 66) Colic M, Stojic-Vukanic Z, Pavlovic B, et al. Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2003. 134: 63-9.
- 67) Lagaraine C, Lebranchu Y. Effects of immunosuppressive drugs on dendritic cells and tolerance induction. *Transplantation* 2003. 75 (S8): 37-42
- 68) Allison AC, Kowalski WJ, Muller CJ, et al. Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc* 1993. 25 (S2): 67-70
- 69) Glomsda BA, Blaheta RA, Hailer NP et al. Inhibition of monocyte/endothelial cell interactions and monocyte adhesion molecule expression by the immunosuppressant mycophenolate mofetil. *Spinal Cord* 2003. 41: 610-9.
- 70) Ward MM. Outcomes of renal transplantation among patients with end stage renal disease caused by lupus nephritis. *Kidney International* 2000. 57: 2136-43
- 71) Mendoza FA, Nagle SJ, Lee JB, et al. A prospective observational study of mycophenolate mofetil treatment in progressive diffuse cutaneous systemic sclerosis of recent onset. *J Rheumatol* 2012; 39: 1241-1247.

- 72) Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR et al. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998. 34: 429-455
- 73) Liossis SN, Bounas A, Andonopoulos AP et al. Mycophenolate mofetil as first-line treatment improves clinically evident early scleroderma lung disease. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 1005-1008
- 74) Gerbino AJ, Goss CH, Molitor JA et al. Effect of mycophenolate mofetil on pulmonary function in scleroderma-associated interstitial lung disease. *Chest* 2008; 133: 455-460.
- 75) Zamora AC, Wolters PJ, Collard HR, et al. Use of mycophenolate mofetil to treat scleroderma-associated interstitial lung disease. *Respir Med* 2008; 102: 150-155.
- 76) Swigris JJ, Olson AL, Fischer A, et al. Mycophenolate mofetil is safe, well tolerated, and preserves lung function in patients with connective tissue disease-related interstitial lung disease. *Chest* 2006; 130: 30-36
- 77) Nihtyanova SI, Brough GM, Black CM, et al. Mycophenolate mofetil in diffuse cutaneous systemic sclerosis--a retrospective analysis. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 442-445.
- 78) Fischer A, Brown KK, Du Bois RM, et al. Mycophenolate mofetil improves lung function in connective tissue disease-associated interstitial lung disease Comment in *J Rheumatol*. 2013 May;40(5):539-41.
- 79) Cappelli S, Guiducci S, Bellando et al. Immunosuppression for interstitial lung disease in systemic sclerosis. *eur respir Rev*. 2013 Sep 1;22(129):236-43.
- 80) Tan A, Denton CP, Mikhailidis DP, et al. Recent advances in the diagnosis and treatment of interstitial lung disease in systemic sclerosis (scleroderma): a review. *Clin Exp Rheumatol*. 2011 mar-apr;29(2 suppl 65):s66-74.
- 81) McGonagle D, Tan AL, Madden J, et al. Successful treatment of resistant scleroderma-associated interstitial lung disease with rituximab. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 552-553.
- 82) Haroon M, McLaughlin P, Henry M, et al. Cyclophosphamide-refractory scleroderma-associated interstitial lung disease: remarkable clinical and

- radiological response to a single course of rituximab combined with high-dose corticosteroids. *Ther Adv Respir Dis* 2011; 5: 299-304.
- 83) Yoo WH. Successful treatment of steroid and cyclophosphamide-resistant diffuse scleroderma-associated interstitial lung disease with rituximab. *Rheumatol Int* 2012; 32: 795-798.
- 84) Daoussis D, Liossis SN, Tsamandas AC, et al. Effect of long-term treatment with rituximab on pulmonary function and skin fibrosis in patients with diffuse systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30(2 Suppl 71):S17-22.
- 85) Spiera RF, Gordon JK, Mersten JN, et al. Imatinib mesylate (Gleevec) in the treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis: results of a 1-year, phase IIa, single-arm, open-label clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 1003-1009
- 86) Tyndall A, Gratwohl A. Immune ablation and stem-cell therapy in autoimmune disease. Clinical experience. *Arthritis Res* 2000; 2: 276-280.
- 87) Massad MG, Powell CR, Kpodonu J, et al. Outcomes of lung transplantation in patients with scleroderma. *World J Surg* 2005; 29: 1510-1515.
- 88) Panopoulos ST, Bournia VK, Trakada G, et al. Mycophenolate versus cyclophosphamide for progressive interstitial lung disease associated with systemic sclerosis: a 2-year case control study. *Lung*. 2013 Oct;191(5):483-9.
- 89) Abhishek A, Yazdani R, Pearce F, et al. Outcome of systemic sclerosis associated interstitial lung disease treated with intravenous cyclophosphamide. *Clin Rheumatol*. 2011 Aug;30(8):1099-104
- 90) Le EN, Wigley FM, Shah AA, et al. Long-term experience of mycophenolate mofetil for treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jun;70(6):1104-7.