

LAVORO ORIGINALE

Flogosi cronica e disfunzione endoteliale: analisi di una coorte di pazienti affetti da LES e UCTD*

Chronic inflammation and endothelial dysfunction: analysis of a cohort of patients with SLE and UCTD

C. Tani¹, M. Mosca¹, A. d'Ascanio¹, D. Versari², A. Viridis², L. Ghiadoni²,
S. Taddei², A. Salvetti², S. Bombardieri¹

¹UO Reumatologia, Dipartimento di Medicina Interna

²Centro di studio dell'ipertensione arteriosa, Dipartimento di Medicina Interna; Università di Pisa

SUMMARY

Objective: Cardiovascular complications, mainly caused by an accelerated atherosclerosis, are one of the leading causes of death and disability in patients with systemic autoimmune diseases. Endothelial dysfunction is considered the earliest and reversible step of atherogenesis. Aim of the present study is to investigate endothelial function (EF) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), undifferentiated connective tissue diseases (UCTD) and correlate the results with clinical and laboratory variables.

Methods: EF was assessed on the peripheral microcirculation by the perfused forearm technique that can estimate both endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation. The same evaluation has been repeated in two patients after the administration of 20 mg of 6-metilprednisolone.

Results: Twenty-three female patients with SLE or UCTD, with a follow up of at least 1 year have been studied and compared with 8 healthy controls matched for epidemiological variables and traditional risk factors for cardiovascular disease.

A significant reduction both in endothelium dependent than endothelium independent vasodilatation was observed in both patients groups compared with controls. In addition, UCTD patients demonstrated a significant reduction in the nitric oxide pathway compared with controls and SLE patients. Finally, steroid administration induced an improvement of vascular reactivity.

Conclusions: Despite the well documented side effects of chronic corticosteroid therapy, our data might suggest a role for antiinflammatory and immunosuppressive therapy in the prevention of premature atherosclerosis in patients with systemic autoimmune diseases.

Reumatismo, 2006; 58(3):212-218

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni evidenze sempre più numerose hanno sottolineato un'augmentata incidenza di complicanze cardiovascolari precoci su base aterosclerotica in corso di malattie autoimmuni sistemiche come il lupus eritematoso sistemico (LES), l'ar-

trite reumatoide (AR) e le vasculiti sistemiche. Sebbene i tradizionali fattori di rischio cardiovascolare giochino un ruolo importante nella patogenesi dell'aterosclerosi accelerata cui vanno incontro tali pazienti, potrebbero essere coinvolti anche fattori aggiuntivi malattia-specifici quali la flogosi sistemica cronica e i disordini immunologici (1-7).

In tempi relativamente recenti, infatti, è stata formulata la ipotesi che il processo aterogenetico non sia semplicemente il risultato di un progressivo ed abnorme accumulo di lipidi all'interno della parete vasale, ma che la lesione aterosclerotica sia il risultato di reazioni cellulari e molecolari altamente specifiche che possono essere considerate, nel loro complesso, una risposta infiammatoria (8).

*Lavoro premiato al XLII Congresso SIR, Verona 2005

Indirizzo per corrispondenza:

Dott.ssa Marta Mosca

UO Reumatologia, Dipartimento di Medicina Interna,

Università di Pisa

Via Roma, 67, I-56126 Pisa

E-mail: marta.mosca@int.med.unipi.it

L'endotelio gioca un ruolo centrale nel mantenimento della funzionalità e dell'integrità vascolare, soprattutto attraverso la via dell'ossido nitrico (NO). Si definisce disfunzione endoteliale (DE) quella condizione caratterizzata da una ridotta disponibilità di NO attualmente considerata l'alterazione più precoce attraverso cui la flogosi vascolare può condurre al danno vascolare aterosclerotico (8, 9). Una ridotta funzione endoteliale, già descritta a livello di distretti di macrocircolo in pazienti con LES, AR e vasculite sistemica, può costituire uno dei meccanismi attraverso cui si innesca il processo aterogenetico in queste condizioni (10-12).

Nel presente studio abbiamo valutato la funzione endoteliale in un gruppo di pazienti affetti da LES e connettivite indifferenziata (UCTD) e confrontata con soggetti sani.

METODI

Pazienti

Sono state arruolate 23 pazienti di sesso femminile seguite presso la nostra Unità Operativa da almeno un anno per LES o UCTD; le pazienti con LES in esame soddisfacevano i criteri classificativi ACR mentre per le UCTD la diagnosi era stata formulata sulla base dei criteri pubblicati (13). Per i controlli si è fatto riferimento ad un gruppo storico di soggetti sani selezionati dagli archivi del Dipartimento di Medicina Interna e sovrapponibili per età e sesso alle pazienti selezionate.

L'anamnesi farmacologica di ciascuna paziente, con particolare attenzione verso precedenti terapie con corticosteroidi, antimalarici ed altri immunosoppressori, è stata ricostruita a partire dalle cartelle cliniche personali; per ciascuna paziente in esame è stata calcolata la dose cumulativa di steroidi assunta fino all'arruolamento e la dose media giornaliera nell'ultimo anno.

Il giorno dello studio sono stati raccolti i dati epidemiologici, le manifestazioni cliniche attive, l'attività globale di malattia di ciascuna paziente (sulla base della scala European Consensus Lupus Activity Measurement - ECLAM - per i LES e sulla base del giudizio clinico globale- Physician's Global Assessment- su scala visiva da 0 a 10 per le UCTD) (15). Per ciascuna paziente arruolata è stata eseguita una stratificazione del rischio cardiovascolare globale prendendo in considerazione come tradizionali fattori di rischio cardiovascolare la familiarità per eventi cardiovascolari precoci (prima dei 55 o 65 anni di età in parenti di primo grado rispettivamente

di sesso maschile o femminile), l'obesità, il fumo di sigaretta, l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia.

Esami di laboratorio

Il giorno dell'arruolamento le pazienti sono state sottoposte ad una batteria di esami ematochimici comprendenti emocromo completo, indici di funzionalità renale ed epatica, profilo proteico e lipidico (colesterolo totale, HDL e LDL, trigliceridi), omocisteinemia, vitamina B12 e folati, indici di flogosi (VES, PCR, Fibrinogeno), complementemia (C3 e C4); sono stati inoltre raccolti un esame delle urine a fresco ed una proteinuria delle 24 ore. Sono stati testati con tecniche validate i seguenti autoanticorpi: anticorpi antinucleo (ANA) e anti-dsDNA (Crithidia), anti-ENA (anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP, anti-Sm, anti-Scl70, anti-Jo1, anti-Ku), anti-cardiolipina e LAC test (16).

Test di reattività vascolare

La reattività vascolare è stata valutata mediante la tecnica dell'avambraccio isolato e perfuso (17). La tecnica prevede la cannulazione dell'arteria brachiale per l'infusione di sostanze vasoattive. La vasodilatazione endotelio-dipendente è stata calcolata su una curva dose-risposta all'infusione di acetilcolina (Ach, Farmigea SpA, Pisa, Italy; secondo uno schema di dosi crescenti: 0,15, 0,45, 1,5, 4,5, 15 µg/100 ml tessuto di avambraccio/minuto per 5 minuti per ciascuna dose). La vasodilatazione endotelio-indipendente è stata calcolata su una curva dose-risposta all'infusione intrarteriosa di sodio nitroprussiato, un rilassante diretto della muscolatura liscia vasale (SNP, Malesci, Milan, Italy; 1, 2 e 4 µg/100 ml tessuto avambraccio/min, 5 min ciascuna dose). Per valutare una possibile alterazione nella disponibilità di NO, l'infusione di Ach è stata ripetuta insieme all'infusione intrarteriosa di N-Monometil-arginina, uno specifico inibitore della NO- sintetasi (L-NMMA, Clinalfa AG, Läufelfingen, Switzerland; 100 µg/100 ml tessuto avambraccio/minuto).

Le variazioni di flusso sanguigno a livello dell'avambraccio (FBF) sono state misurate mediante una pletismografia venosa a *strain gauge*.

Analisi statistiche

Tutte le variabili sono state analizzate in modo indipendente con test statistici appropriati (Mann-Whitney U-test e χ^2 test). Le variabili continue sono state comparate con il test di Spearman's, il test ANOVA è stato applicato quando opportuno per

misure ripetute. È stato considerato statisticamente significativo un valore $p < 0,05$.

RISULTATI

Nello studio sono state arruolate 23 pazienti di sesso femminile (14 con diagnosi di UCTD e 9 con diagnosi di LES), tutte con malattia inattiva. Al momento dell'arruolamento l'età media delle partecipanti allo studio è risultata di $38,4 \pm 10,1$ anni per le UCTD e $39,4 \pm 4,6$ anni per i LES (p : ns); la durata media di malattia calcolata al momento dello studio è risultata di $10,3 \pm 5,8$ anni per le UCTD e $14,1 \pm 7,8$ anni per i LES (p : ns).

Come popolazione di controllo è stata selezionato un gruppo di 8 donne sane con caratteristiche sovrapponibili alle pazienti per età e profilo di rischio cardiovascolare.

Le manifestazioni cliniche presenti all'arruolamento e i risultati degli esami di laboratorio sono riportati nella tabella I. In tutte le pazienti esaminate vi-

Tabella I - Principali caratteristiche cliniche e di laboratorio, tradizionali fattori di rischio cardiovascolare presenti al momento dell'arruolamento nelle pazienti con UCTD e LES.

| Variabili | UCTD | LES |
|--|-----------------|----------------|
| Età (anni) | $38,4 \pm 10,1$ | $39,4 \pm 4,6$ |
| Durata di malattia (anni) | $10,3 \pm 5,8$ | $14,1 \pm 7,8$ |
| Familiarità per eventi CV precoci | 7 (50%) | 4 (44%) |
| Fumo di sigaretta | 4 (29%) | 2 (22%) |
| Iperensione | 0 | 1 (11%) |
| Diabete mellito | 0 | 0 |
| Ipercolesterolemia | 0 | 0 |
| Obesità | 0 | 0 |
| Fenomeno di Raynaud | 8 (57%) | 4 (44%) |
| Vasculite cutanea | 0 | 1 (11%) |
| Livaedo reticularis | 3 (21%) | 4 (44%) |
| Tiroidite autoimmune | 1 (7%) | 2 (22%) |
| Anticorpi anti-Ro/SSA | 3 (21%) | 2 (22%) |
| Anticorpi anti-RNP | 2 (14%) | 1 (11%) |
| Anticorpi anti-dsDNA | 0 | 0 |
| Anticorpi anti-fosfolipidi (LA, anti-cardiolipina) | 2 (14%) | 1 (11%) |

Tabella II - Terapia assunta dalle pazienti al momento dell'arruolamento nello studio.

| Variabili | LES | UCTD |
|------------------------------------|-------------|--------------|
| Nessuna terapia | 1/9 (11%) | 4/14 (28,5%) |
| Non terapia steroidea | (2) 22% | (8) 57% |
| Steroidi (basse dosi) | 7/9 (77,8%) | 6/14 (42,8%) |
| Antimalarici | 5/9 (55,5%) | 6/14 (42,8%) |
| Azatioprina | 2/9 (22%) | 1/14 (7,1%) |
| Altri immunosoppressori (CFX, MMF) | 0 | 0 |

tamina B12, folati e omocisteina sono risultati nei rispettivi range di normalità.

Tra il gruppo di pazienti con UCTD e quello con LES non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nella prevalenza dei tradizionali fattori di rischio cardiovascolare. Tre delle pazienti con LES presentavano una storia di impegno renale e di coinvolgimento del sistema nervoso centrale.

In tabella II sono riportate le terapie assunte dalle pazienti al momento dell'arruolamento. Come si può osservare una percentuale significativa di pazienti con UCTD non assumeva alcuna terapia farmacologica rispetto alle pazienti con LES; in entrambi i gruppi le terapie maggiormente assunte erano basse dosi di steroidi ed antimalarici. È stata osservata una differenza statisticamente significativa tra il gruppo di pazienti con UCTD e LES per quanto concerne la dose media giornaliera di steroidi nel corso dell'ultimo anno precedente l'arruolamento: tale dose è risultata 1 mg nelle pazienti con UCTD e 4 mg nelle pazienti con LES ($p < 0,01$).

Reattività vascolare

La vasodilatazione in risposta all'infusione di Ach (endotelio dipendente) è risultata significativamente ridotta ($p < 0,0001$) in entrambi i gruppi di pazienti rispetto ai controlli sani (Fig. 1) ma non è stata osservata nessuna significativa differenza nell'entità della vasodilatazione tra UCTD e LES. Anche la risposta vascolare al SNP (vasodilatazione endotelio-indipendente) è risultata significativamente ridotta in entrambi i gruppi di pazienti rispetto al gruppo di controllo ($p < 0,0001$) (Fig. 1).

Come atteso, la risposta vascolare all'acetilcolina è risultata significativamente ($p < 0,001$) inibita dalla L-NMMA nei controlli sani (-52% della rispo-

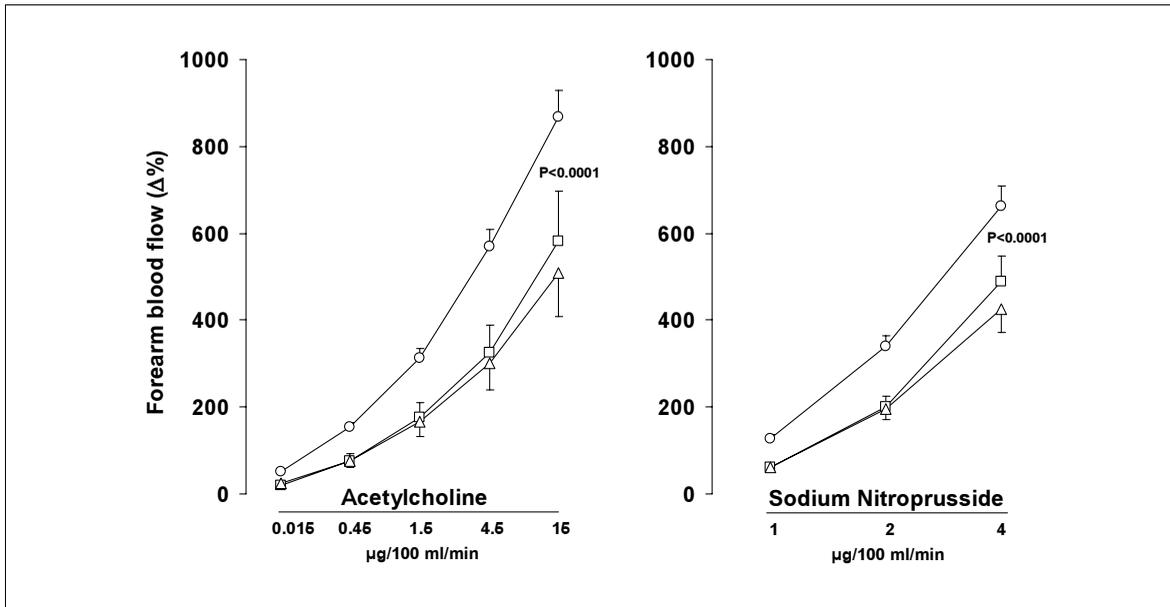


Figura 1 - Incremento percentuale di flusso sanguigno dell'avambraccio (FBF) rispetto al basale indotto dall'Acetilcolina (Ach) e dal sodio nitroprussiato in controlli sani (cerchi), in pazienti affette da UCTD (quadrati) e LES (triangoli). Le risposte all'Ach e al sodio nitroprussiato sono significativamente ridotte nei pazienti rispetto ai controlli. Nessuna significativa differenza osservata tra UCTD e LES.

sta massimale all'Ach, Fig. 2). Anche nelle pazienti con LES la L-NMMA ha dimostrato un effetto inibitorio sulla Ach ma significativamente inferiore rispetto ai controlli ($p < 0.05$ vs Ach da sola; -25% sulla risposta massimale all'Ach) (Fig. 2). Al contrario, nelle pazienti con UCTD la L-

NMMA non ha prodotto un effetto inibitorio ($p = n.s.$ vs Ach da sola; -8% della risposta massimale all'Ach) (Fig. 2). Dall'analisi univariata dei dati non è stata osservata alcuna correlazione tra la risposta massimale all'Ach e le manifestazioni cliniche presenti al mo-

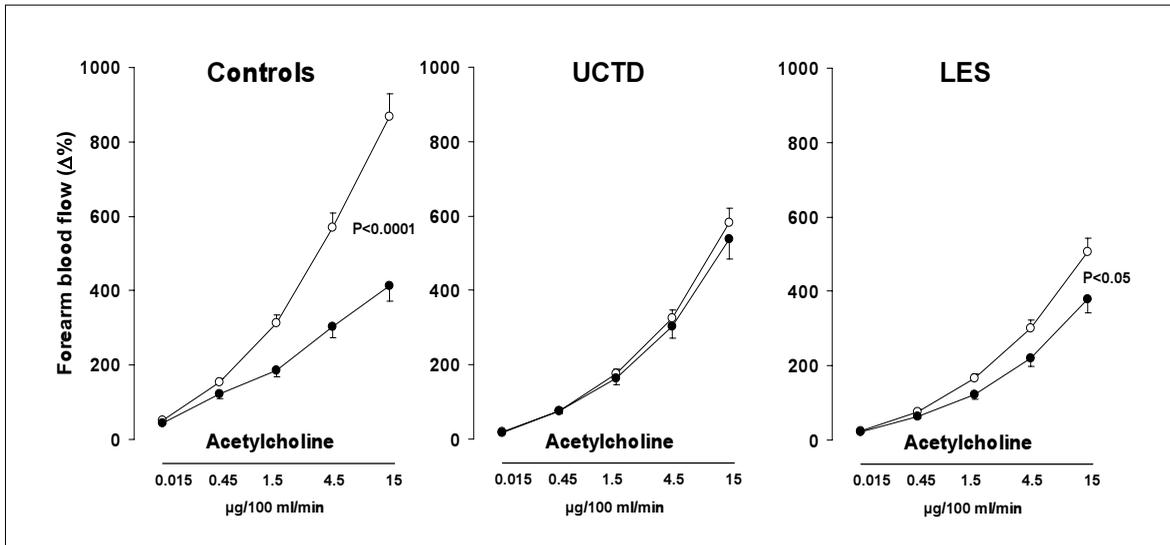


Figura 2 - Incremento percentuale di flusso sanguigno dell'avambraccio (FBF) rispetto al basale indotto dall'Acetilcolina (Ach) durante l'infusione di una soluzione salina (cerchi vuoti) o in presenza di N- Monometil-arginina (L-NMMA; cerchi pieni) nei controlli, e in pazienti affetti da UCTD e LES. La risposta all'Ach, largamente inibita dalla L-NMMA nei controlli, risulta invariata nelle UCTD e solo parzialmente ridotta per l'effetto di inibizione della sintesi di NO nei LES.

mento dello studio o il pregresso impegno renale. In ultimo, in due delle pazienti in studio è stato ripetuto il test di reattività vascolare dopo l'infusione di 20 mg di metilprednisolone e sono state osservate una maggiore risposta vasodilatatoria all'Ach (risposta massimale $267 \pm 10\%$ versus $686 \pm 302\%$) ed un maggior effetto inibitorio della L-NMMA sulla vasodilatazione indotta dall'Ach (dal -3% al -34% sulla risposta massimale).

DISCUSSIONE

La presenza di una aterosclerosi accelerata è stata descritta in diverse malattie autoimmuni sistemiche come LES, AR, e vasculiti sistemiche. Numerosi studi indicano che il rischio cardiovascolare complessivo delle donne affette da LES è circa 50 volte superiore rispetto a quello di donne sane di pari età.

Il LES potrebbe contribuire allo sviluppo del processo aterogenetico precoce attraverso due distinte vie: indirettamente a causa dell'associazione con fattori di rischio tradizionali (diabete, ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia) risultato delle complicanze della malattia stessa o della sua terapia e in modo diretto a causa del processo infiammatorio cronico e dei disordini immunitari che lo contraddistinguono (1-7, 10).

La disfunzione endoteliale è attualmente considerata l'evento più precoce nell'ambito del complesso processo aterosclerotico (9) ed essa può essere evidenziata con tecniche di reattività vascolare. Nel presente studio è stata utilizzata una tecnica altamente sensibile per la valutazione della reattività vascolare: la vasodilatazione endotelio-dipendente ed endotelio-indipendente in risposta all'infusione, rispettivamente, di Ach e sodio nitroprussiato; la stessa tecnica, inoltre, ha consentito di esplorare la biodisponibilità di NO durante la stimolazione con Ach (17).

Dai test eseguiti è emerso che le pazienti esaminate presentano una ridotta risposta vascolare allo stimolo con Ach rispetto ai controlli sani a suggerire la presenza di una alterata risposta endotelio-dipendente. Non è stata trovata alcuna significativa correlazione tra le manifestazioni cliniche e il titolo autoanticorpale delle pazienti in studio e la presenza di disfunzione endoteliale.

Tale dato risulta in linea con precedenti osservazioni su LES e altre malattie autoimmuni come vasculiti sistemiche e AR (10-12). Tuttavia, mentre studi precedenti, in cui peraltro è stata utilizzata una

tecnica non invasiva e meno sensibile per valutare il macrocircolo periferico, hanno riportato una conservata risposta endotelio-indipendente, nelle nostre pazienti è stata registrata anche una compromissione della vasodilatazione in risposta al sodio nitroprussiato, un rilassante diretto della muscolatura liscia vascolare; tale aspetto starebbe ad indicare che a livello del microcircolo queste condizioni autoimmuni si associano ad una ridotta reattività vascolare generalizzata che potrebbe essere l'espressione della presenza di alterazioni vascolari strutturali.

Contrariamente a quanto atteso, le pazienti affette da UCTD hanno presentato una DE simile alle pazienti affette da LES e hanno dimostrato un minor effetto inibitorio della L-NMMA sull'Ach rispetto alle pazienti con LES ($p < 0.05$) a dimostrazione di una ridotta biodisponibilità di ossido nitrico più marcata. Il fatto che una disfunzione endoteliale sia documentabile anche in pazienti affette da connettivite indifferenziata, una malattia che si caratterizza per un profilo clinico lieve privo di complicanze d'organo tanto da non richiedere, spesso, alcuna terapia di fondo, e il fatto che, anzi, in tali pazienti assuma caratteristiche di maggior gravità rispetto alle pazienti con LES supporta le ipotesi già presenti in letteratura sul possibile ruolo delle malattie autoimmuni di per se nel determinare tale alterazione e, successivamente, la formazione della placca.

Un possibile contributo della terapia anti-infiammatoria alla prevenzione del danno vascolare nella nostra popolazione di pazienti è suggerito dal fatto che le pazienti con UCTD non assumevano terapia al momento dell'arruolamento o avevano assunto solo per brevi periodi di tempo basse dosi di steroidi; al contrario le pazienti con LES si trovavano in terapia cronica con basse dosi di steroidi e antimalarici. Infatti, la dose media di steroidi è risultata significativamente più alta nelle pazienti con LES rispetto alle pazienti con UCTD.

Tale ipotesi risulta ulteriormente avvalorata del risultato ottenuto dopo somministrazione acuta di corticosteroidi.

In conclusione i nostri risultati suggeriscono che una terapia antinfiammatoria potrebbe giocare un ruolo nel controllo della disfunzione endoteliale e, in ultima analisi, nella riduzione del rischio di aterosclerosi precoce; tale considerazione si trova in accordo con due recenti lavori che dimostrano l'assenza di correlazione tra incidenza di aterosclerosi precoce e terapia steroidea in pazienti con LES e, viceversa, una più bassa incidenza di

placche aterosclerotiche carotidiche in pazienti trattati con prednisone, ciclofosfamide e idrossiclorochina (6, 7).

Tali considerazioni preliminari necessitano di ulteriore conferma mediante studi più ampi volti da un lato a chiarire il ruolo della terapia anti-infiamma-

toria e/o immunosoppressiva nella riduzione del rischio cardiovascolare in pazienti affetti da malattie autoimmuni sistemiche, e dall'altro a valutare l'opportunità di una terapia mirata in tal senso anche in pazienti che presentano una malattia inattiva o non severa come le UCTD.

RIASSUNTO

Scopo: La disfunzione endoteliale è considerata il più precoce e reversibile passaggio del processo di formazione della placca aterosclerotica. Scopo del presente lavoro è quello di valutare la funzione endoteliale in una popolazione di pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) e connettivite indifferenziata (UCTD) e di correlare i risultati con variabili cliniche e sierologiche.

Metodi: La valutazione della funzione endoteliale è stata effettuata a livello del microcircolo periferico dell'avambraccio utilizzando la "tecnica dell'avambraccio isolato e perfuso" che consente di esplorare sia la vasodilatazione endotelio dipendente che endotelio indipendente. In una seconda fase dello studio, il test è stato ripetuto in due pazienti dopo la somministrazione di 20 mg di 6-metilprednisolone.

Risultati: Sono state studiate 23 pazienti affette LES o UCTD con un follow up >1 anno e 8 soggetti sani (controlli) con analoghe caratteristiche epidemiologiche e profilo di rischio cardiovascolare. Le pazienti esaminate hanno presentato una riduzione significativa della vasodilatazione sia endotelio dipendente che endotelio indipendente rispetto ai controlli; inoltre, le pazienti affette da UCTD hanno mostrato una minore biodisponibilità di ossido nitrico rispetto ai controlli e alle pazienti con LES. L'infusione di steroide ha determinato in entrambi i casi testati un miglioramento della risposta vascolare. Non sono state osservate correlazioni tra la funzione endoteliale e le variabili cliniche e di laboratorio considerate.

Conclusioni: Pur a fronte dei ben noti effetti collaterali della terapia steroidea cronica ad alte dosi anche sul versante cardiovascolare, tali dati possono suggerire un ruolo per la terapia antinfiammatoria e immunomodulatrice nella prevenzione della aterosclerosi accelerata in pazienti affette da malattie autoimmuni sistemiche.

Key words - Connettiviti indifferenziate, lupus eritematoso sistemico, aterosclerosi precoce, funzione endoteliale.

Parole chiave - *Undifferentiated connective tissue diseases, systemic lupus erythematosus, premature atherosclerosis, endothelial function.*

BIBLIOGRAFIA

- Manzi S. Systemic lupus erythematosus: a model for atherogenesis? *Rheumatology* 2000; 39: 353-9.
- Salmon JE, Roman MJ. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: implications for patient management. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13: 341-4.
- Svenungsson E, Jensen-Urstad K, Heimburger M, Silveira A, Hamsten A, de Faire U, et al. Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Circulation* 2001; 104: 1887-93.
- Bruce IN, Urowitz MB, Gladman DD, Ibanez D, Steiner G. Risk factors for coronary heart disease in women with systemic lupus erythematosus. The Toronto risk factor study. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3159-67.
- El-Magadmi Im, Bodill H, Ahmad Y, Durrington PN, Mackness M, Walker M, et al. Systemic lupus erythematosus. An independent risk factor for endothelial dysfunction in women. *Circulation* 2004; 110: 399-404.
- Roman MJ, Shaker BA, Davis A, Lockshin MD, Sammaritano L, Simantow R, et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *New Engl J Med* 2003; 349: 2399-406.
- Asanuma Y, Oeser A, Shintani AK, Turner E, Olsen N, Fazio S, et al. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349: 2407-15.
- Ross R. Atherosclerosis, an inflammatory disease. *New Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
- Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005; 23: 233-46.
- Lima DSN, Sato EI, Lima VC, Miranda F, Hatta FH. Brachial endothelial function is impaired in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002; 29: 292-7.
- Vaudo G, Marchesi S, Gerli R, Allegrucci R, Giordano A, Siepi D et al. Endothelial dysfunction in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 31-5.
- Booth AD, Wallace S, McEniery CM, Yasmin, Brown J, Jayne DRW, et al. Inflammation and ar-

- terial stiffness in systemic vasculitis. A model of vascular inflammation. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 581-8.
13. Mosca M, Neri R, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a review of the literature and a proposal for preliminary classification criteria. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 615-20.
 14. Mosca M, Baldini C, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases in 2004. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22: S 14-8.
 15. Lam GK, Petri M. Assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23: S120-132 (ECLAM).
 16. Charles PJ, van Venroij WJ, Maini RN and the Consensus Finding Group for Autoantibodies. The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases: 1989-1992. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 507-13.
 17. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 1998; 97: 2222-9.