

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ



**MODALITĂȚI DE EVALUARE A AFECTĂRII CUTANTE ÎN BOLILE
CONJUNCTIVO-VASCULARE IMUN MEDIATE**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Prof. Univ. Dr. PAULINA LUCIA CIUREA

STUDENT-DOCTORAND:

Claudia Cîrstea

CRAIOVA 2015

CUPRINS

STADIUL CUNOAȘTERII.....	3
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII.....	5
MATERIAL ȘI METODĂ.....	6
REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	7
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	23

Cuvinte cheie: sclerodermie sistemmică, lupus, dermatomiozită, capilaroscopie, imunohistochimie

STADIUL CUNOAȘTERII

Afectarea cutanată reprezintă o modificare esențială în conturarea diagnosticului unei boli conjunctivo-vasculare imun-mediate, atât pentru dermatolog, cât și pentru reumatolog, majoritatea acestora fiind de cele mai multe ori modalitatea de debut. Mai mult, evoluția pattern-ului afectării cutanate reprezintă un indicator al activității de boală, fiind direct inter-relaționată cu aceasta și, implicit, cu severitatea extensiei sistemice și afectarea de organ, și reprezintă un factor determinant al calității vieții pacienților. Evaluarea eficacității tratamentului și monitorizarea pacienților implică utilizarea scorurilor care apreciază extensia și severitatea manifestărilor cutanate în diverse afecțiuni, cum ar fi LES sau SSc.

Manifestările cutanate pot fi specifice, patognomonice pentru o anumită afecțiune, și sunt însoțite de aspecte histo-patologice tipice, iar în alte situații observăm elemente cutanate ce pot aparține mai multor entități patologice, nespecifice; de cele mai multe ori, manifestările cutanate din bolile conjunctivo-vasculare imun-mediate sunt multiple, asociind leziuni specifice și non-specifice ce reprezintă indicatori cu semnificație diagnostică.

Astfel, scopul lucrării s-a concretizat în abordarea duală, clinică și paraclinică, a afectării cutanate la pacienții cu boli conjunctivo-vasculare imun mediate, prin abordarea a trei entități frecvent întâlnite în practica curentă, lupusul, sclerodermia sistemică și dermatomiozita.

Referitor la metodele de evaluare a afectării cutanate și a microvascularizației periferice, capilaroscopia este o metodă non-invazivă, sigură, reproductibilă, utilizată pentru evaluarea microcirculației *in vivo*, în vederea obiectivării microangiopatiei periferice, cu rol atât diagnostic, cât și pentru aprecierea prognosticului, la pacienții cu patologie a țesutului conjunctiv. Principala aplicație clinică a acestei explorări este reprezentată de deosebirea fenomenului Raynaud asociat sclerodermiei sistemice de fenomenul Raynaud primar. Dintre toate afecțiunile conjunctivo-vasculare imun-mediate, sclerodermia sistemică are cel mai specific pattern capilaroscopic, caracterizat prin prezența de megacapilare și arii avasculare la nivelul patului unghial, prezent la marea majoritate a pacienților: *pattern precoce*: megacapilare, microhemoragii în număr relativ redus, denistate capilară relativ păstrată, fără pierderi capilare evidente; *pattern activ*: megacapilare și microhemoragii frecvente, pierdere moderată de capilare, dezorganizare

arhitecturală moderată, capilare ramificate în număr relativ redus sau absente; *pattern tardiv*: megacapilare și microhemoragii în număr redus sau absent, pierdere importantă de capilare cu zone avasculare extinse, dezorganizare arhitecturală marcată, frecvente capilare ramificate. La pacienții cu LES, cu toate că modificările microvascularizației periferice sunt mai puțin specifice comparative cu celelalte colagenoze, au fost descrise o serie de modificări mai frecvent constatate: *capilare cu tortuozitate crescută, alungite, capilare cu diametru crescut și un plex papilar proeminent*, modificări reunite sub denumirea de “pattern capilaroscopic LES-specific”.

Examenul histo-patologic. Elementele caracteristice evidențiate la examinarea histopatologică a tegumentului pacienților cu SSc, sunt reprezentate de apariția de fibre de colagen, compacte, localizate paralel cu epidermul, însoțite de infiltrate de celule inflamatorii, predominant celule T, perivascular, acumularea de MEC la nivelul dermului și subțierea epidermului. În evoluție apare atrofia anexelor cutanate, consecutiv expansiunii fibrozei la nivelul dermului. Studiile de specialitate arată că modificările pe biopsiile cutanate în *dermatomiozită* sunt reprezentate de alterarea vacuolară a stratului bazal al epidermului, keratinocite necrotice (apoptotice), dilatații vasculare, și redus infiltrat limfocitar perivascular superficial, aspecte constatate într-un spectru larg de leziuni clinice de DM. În general erupția maculară din *lupus* se însoțește de modificări histologice discrete care au condus la denumirea de „dermatoză invizibilă,„. Astfel, biopsiile exprimă o ușoară degenerescență vacuolară a stratului bazal de keratinocite și infiltrat limfocitar focal la jonțiunea dermo-epidermică.

Examenul histo-patologic poate fi completat de **imunohistochimie** și analiza imunomarcajului pentru diverse matrix-metaloproteinaze. Matrix metaloproteinazele (MMP) sunt o familie de endopeptidaze, calciu dependente responsabile de degradarea matricei extracelulare, inclusiv colagenul, elastina, gelatina, glicoproteinele matriceale și proteoglicanii. MMP-urile sunt excretate de o varietate de celule ale țesutului conjunctiv și celulele proinflamatorii precum fibroblastele, celulele endoteliale, osteoblaste, macrofage, limfocite și neutrofile; degradează colagenul de tip IV și V și alte proteine ale matricei extracelulare. Matrixmetaloproteinaza 3 (MMP 3) sau stromelizina-1 poate degrada multe componente ale matricei extracelulare și, de asemenea, poate activa alte pro-MMP, inclusiv pro-MMP-1 și pro-MMP- 9. Matrixmetaloproteinaza 9 (MMP 9) sau gelatinaza B, a fost asociată cu boli inflamatorii cronice autoimune, inclusiv cu artrita reumatoidă, sindromul Sjogren, uveita idiopatică și lupus eritematos sistemic.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII

Scopul lucrării constă în abordarea duală, clinică și paraclinică, a afectării cutanate la un lot de pacienți cu boli conjunctivo-vasculare imun mediate, orientându-ne spre trei entități frecvente în practica curentă: lupusul, sclerodermia sistemică și dermatomiozita. Lucrarea își propune să sistematizeze aspectele clinice, bio-umorale, imagistice și histo-patologice și să realizeze o evaluare concretă a afectării cutanate. Cercetarea personală s-a orientat spre studiul corelațiilor dintre manifestările cutanate și aspectele capilaroscopice, histopatologice și imunohistochimice.

Obiectivele studiului sunt reprezentate de:

- Evaluarea prezenței și a tipului manifestărilor cutanate la pacienții cu afecțiuni conjunctivo-vasculare imun mediate.
- Corelarea aspectului clinic al afectării cutanate cu severitatea manifestărilor viscerale întâlnite la acești pacienți.
- Stabilirea factorilor de risc predictivi ai afectării viscerale și implicit ai prognosticului în funcție de extensia interesării cutanate.
- Evaluarea microvascularizației periferice prin intermediul capilaroscopiei periunghiale.
- Analiza corelațiilor între modificările microcirculatorii, expresia clinică cutanată și extensia sistemică a afecțiunii.
- Aprecierea modificărilor histo-patologice pe fragmentele de biopsie cutanată și musculară.
- Urmărirea expresiei matrix metaloproteinazei 3 (MMP-3) și matrix metaloproteinazei 9 (MMP 9) pe fragmentele de biopsie cutanată la cohorta de studiu și la lotul martor.
- Implicațiile expresiei imunohistochimice asupra interesării sistemice.

MATERIAL ȘI METODĂ

Am efectuat un studiu prospectiv, pe un număr de 100 de pacienți cu boli conjunctivo-vasculare imun mediate dintre care 47 cu boală lupică, 39 pacienți cu scleroză sistemică și 20 pacienți cu dermatomiozită. Studiul s-a desfășurat pe o perioadă de patru ani, în Clinicile Reumatologie și Dermatologie ale Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova în perioada noiembrie 2011 - ianuarie 2015. Investigațiile biologice și imunologice s-au efectuat în Laboratorul Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, iar cele imunohistochimice în Laboratorul de Anatomie Patologică și Citologie din cadrul aceluiași spital.

Design-ul studiului a presupus includerea și evaluarea pacienților cu boli conjunctivo-vasculare imun mediate, diagnosticați conform criteriilor în vigoare, din punct de vedere al duratei de evoluție a bolii, progresiei bolii, testelor de inflamație și imunologice, examinării microvascularizației periferice prin intermediul capilaroscopiei periunghiale și efectuarea examenului histopatologic și imunohistochimic.

Capilaroscopia a fost realizată utilizând un videocapilaroscop Video DS Medica 3.0, de către același examinator. În scopul evitării artefactelor și obținerii de imagini neconcludente, este necesar ca pe suprafața unghiilor să nu fie aplicat lac și cuticulele să nu fie tăiate cu cel puțin 7 zile anterior examinării.

Examenul histopatologic și studiul imunohistochimic. Fragmentele de biopsie cutanată și musculară au fost prelucrate cu ajutorul tehnicii histopatologice clasice de includere la parafină, iar preparatele histologice au fost colorate inițial cu colorația uzuală Hematoxină-Eozină în vederea examenului histopatologic.

Pentru examenul imunohistochimic s-au efectuat secțiuni seriate care au fost imunomarcate cu anticorpi anti-MMP 3 și respectiv anti-MMP-9. Metoda utilizată în cadrul *studiului imunohistochimic* a fost una dintre metodele bazate pe complexe imunoenzimatice solubile, numită **LSAB/HRP (labelled streptavidin biotin)**. Chitul utilizat a fost DAKO LSAB 2 System HRP (Universal DAKO Labeled Streptavidin Biotin 2 System Horseradish Peroxidase). Metoda LSAB (cu streptavidină-biotină) este una din metodele numite ABC (avidin-biotin complex), în care se substituie avidina cu streptavidina și are la bază conjugarea directă a streptavidinei cu moleculele enzimatic.

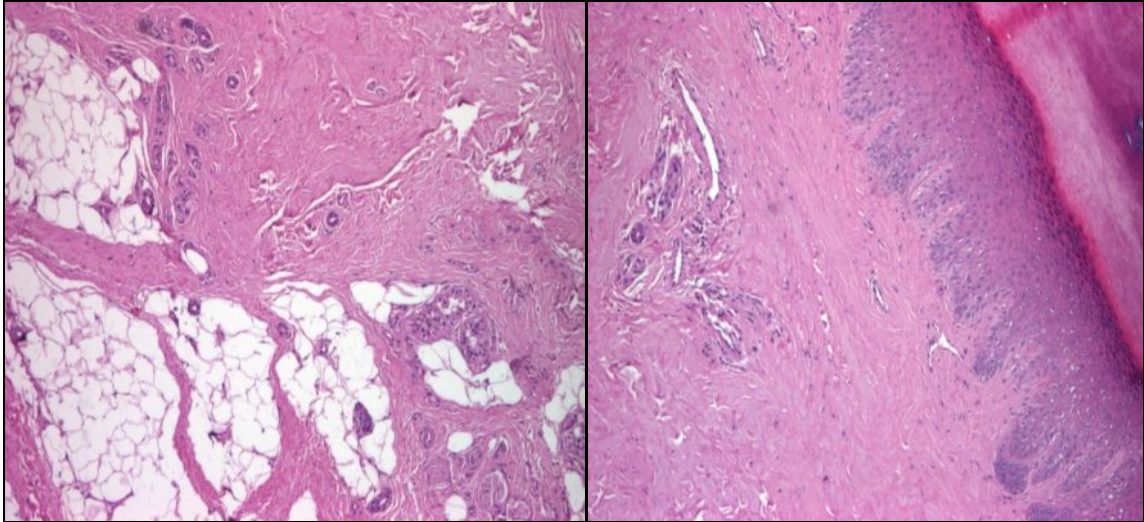
REZULTATE ȘI DISCUȚII

Caracteristicile lotului cu sclerodermie

Evaluarea manifestărilor cutanate ale pacienților, atât cu SScd cât și cu SScl, a relevat prezența sindromului Raynaud la întreg lotul de studiu. Telangiectaziile au fost identificate la 9 din cei 13 pacienți cu SScd (69.23%) și la 20 din cei 26 de subiecți cu SScl (76.92%). Deși am constatat că pacienții cu SScl prezintă în proporție mai mare telangiectazii, diferența față de pacienții cu SScd nu este semnificativă statistic ($p = 0,522$). Ulcerațiile digitale au fost identificate la 61.45% (8) dintre pacienții cu SScd, procentaj semnificativ mai mare comparativ cu cu SScl (26,92%), $p=0,041$. Evaluarea extensiei afectării cutanate, prin intermediul mRSS, a identificat o valoare medie a acestuia de 24.23 ± 8.89 la pacienții cu SScd vs 24.81 ± 9.63 la pacienții cu SScl, diferență ne semnificativă statistic, cu un p calculat prin testul t Student de 0,854.

Explorarea capilaroscopică a identificat prezența pattern-ului de tip „early” (câteva capilare gigante sau dilatate, rare hemoragii, fără arii avasculare) la 6 dintre cei 13 pacienți cu SScd (46.15%) și la 11 din cei 26 de pacienți cu SScl (42.31%), „active pattern” (frecvente capilare gigante și hemoragii, pierdere moderată a capilarelor, ușoară dezorganizare a arhitecturii capilare) la 6 dintre pacienții cu SScd (46.15%) și la 12 dintre cei cu forma limitată (46.15%), iar pattern-ul de tip „late” la 1 pacient cu SScd și la 4 cu SScl. Diferențele dintre modificările microvascularizației periferice identificate prin intermediul capilaroscopiei periunghiale, la cele două loturi de pacienți, nu au fost semnificative statistic, $p=0.925$.

Examenul histo-patologic, esențial în diagnosticul SS, a relevat prezența sclerozei colagene dense la 9 din cei 13 pacienți cu SScd (69.23%) și la 18 din cei 26 de subiecți cu SScl, fără diferențe semnificative statistic între cele două loturi ($p=0.648$). Atrofia parțială a anexelor a fost evidențiată la 6 din cei 13 pacienți cu SScd (46.15%) și la 11 dintre cei 26 de pacienți cu SScl (42.30%). Atrofia totală a anexelor (figura IV.1.11) a fost întâlnită în același procentaj la pacienții cu SScd și SScl din lotul analizat, 46.15%, (în 6 dintre cazurile cu SScd și la 12 pacienți cu SScl).



Aspect de scleroză colagenă, HEX40

Analiza corelațiilor între prezența manifestărilor cutanate, atât la pacienții cu SScd, cât și la cei cu SScl, a relevat numeroase date semnificative statistic, diferențiat în funcție de tipul acestora. Astfel, pentru **ulcerațiile digitale (UD)**, în ceea ce privește durata bolii, am identificat o corelație moderată, $r=0.435$, semnificativă statistic, $p=0.006$, pentru forma difuză, date similare cu cele înregistrate în cazul formei limitate de boală ($r=0.405$, $p=0.006$). Pentru pacienții din lotul analizat nu am decelat o legătură semnificativă între fumat și prezența sau absența UD, 43.75% dintre fumători prezentând ulcerații, comparativ cu 39,13% dintre nefumători, $p=0,732$ ne semnificativ statistic.

Corelații între prezența ulcerațiilor digitale și variabilele pacienților

	Durata bolii		Fumat		Fibroza pulmonară		HTP		mRSS		ACA		Scl70	
	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl
r	0.453	0.405	0.012	0.230	0.536	0.570	0.381	0.536	0.753	0.503	0.149	0.003	0.219	0.352
p	0.006	0.006	0.230	0.122	0.008	0.002	0.99	0.058	0.002	0.008	0.646	0.882	0.471	0.103

Prezența fibrozei pulmonare, în cazul pacienților cu SScd, s-a corelat moderat, $r=0.536$, semnificativ statistic, $p=0.008$, iar în cazul pacienților cu SScl, un r de 0.570, semnificativ statistic, $p=0.0023$.

Am constatat o legătură semnificativă statistic între hipertensiunea pulmonară și prezența ulcerățiilor digitale, respectiv identificarea acestora la 57,89% dintre pacienții cu HTP, în comparație cu 25% dintre pacienții fără HTP. Referitor la scorul Rodnan modificat (mRSS), pentru forma difuză de boală, am constatat o corelație puternică a acestuia cu prezența UD ($r=0.753$), semnificativă statistic, $p=0.0023$; în cazul formei limitate, coeficientul de corelație Spearman a înregistrat o valoare de 0.503, semnificativă statistic, $p=0.0083$.

Pacienții cu ulcerății digitale prezintă în proporție mult mai mare pattern de tip activ la capilaroscopie (75%) decât cei fără ulcerății, la care predomină un rezultat de tip „early pattern” (60,87%), diferență semnificativă statistic, $p=0,010$. Diferențiat, pe cele două forme de boală, 2 dintre pacienții cu SScd și 1 pacient cu SScl și UD și au prezentat un patern de tip „early”, 5 dintre cei cu SScd și 7 SScl au prezentat „active pattern” și 1 pacient cu SScl a prezentat „late pattern”.

În ceea ce privește prezența *telangiectaziilor*, acestea au fost identificate la 9 din cei 13 pacienți cu SScd (69.23%) și la 20 din cei 26 de subiecți cu SScl (76.92%). Deși am constatat că pacienții cu SScl prezintă în proporție mai ridicată telangiectazii, diferența față de pacienții cu SScd nu este semnificativă statistic ($p =0,522$), date similare cu cele publicate de Zhang SZ et al, într-un raport recent din Clin Exp Rheum (1).

În plus, nu am constatat diferențe semnificative statistic între pacienții cu/fără telangiectazii, în ceea ce privește durata bolii, vârsta la debut sau sex. Datele rezultate au fost similare celor din studiul EUSTAR, publicat în 2015.

	Durata bolii		Fumat		Fibroza pulmonară		HTP		mRSS		CRP	
	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl
r	0.453	0.405	0.012	0.230	0.482	0.516	0.381	0.536	0.482	0.516	0.808	0.468
p	0.006	0.006	0.230	0.122	0.002	0.148	0.001	0.058	0.002	0.148	0.008	0.004

Ulcerățiile digitale, manifestare frecventă a SSc, raportate la peste jumătate din cazuri de majoritatea studiilor din literatura de specialitate, amintind raportul recent, din Ann Rheum Dis. 2015 (5) și pe cel din Reumatol Clin, 2012 (5), au fost identificate la 61.45% (8) dintre

pacienții cu SScd, procentaj semnificativ mai mare decât pacienții cu SScl (26,92%), aspect susținut de rezultatul testului Fisher exact, $p=0,041$, semnificativ statistic.

	Durata bolii		Fumat		Fibroza pulmonară		HTP		mRSS		ACA		Scl70	
	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl	SScd	SScl
r	0.453	0.405	0.012	0.230	0.536	0.570	0.381	0.536	0.753	0.503	0.149	0.003	0.219	0.352
p	0.006	0.006	0.230	0.122	0.008	0.002	0.99	0.058	0.002	0.008	0.646	0.882	0.471	0.103

Explorarea capilaroscopică. În cadrul lotului nostru, capilaroscopia periunghială a identificat prezența pattern-ului de tip „early” (câteva capilare gigante sau dilatate, rare hemoragii, fără arii avasculare) la 6 dintre cei 13 pacienți cu SScd (46.15%) și la 11 din cei 26 de pacienți cu SScl (42.31%), „active pattern” (frecvente capilare gigante și hemoragii, pierdere moderată a capilarelor, ușoară dezorganizare a arhitecturii capilare) la 6 dintre pacienții cu SScd (46.15%) și la 12 dintre cei cu forma limitată (46.15%), iar pattern-ul de tip „late” la 1 pacient cu SScd și la 4 cu SScl. Similar datelor publicate recent, în 2015, de Ghizzoni C et al în *Microvasc Res* și Souza EJ în, în *Rev Bras Reumatol*, Lambova S. et al în 2011 și de numeroase alte studii anterioare, la pacienții incluși în studiu, prezența ulcerărilor digitale s-a corelat cu pattern-ul capilaroscopic de tip activ ($p=0.01$), fiind identificat la 75% dintre pacienții cu acest tip de manifestări cutanate. Prezența telangiectaziilor a fost constatată în procent semnificativ statistic mai mare (94.44%) la pacienții cu pattern de tip „activ”, comparativ cu 25% la pacienții cu pattern de tip „late” ($p=0.007$), date concordante cu cele publicate în literatura de specialitate, menționându-l pe cel mai recent, publicat în 2015, în *Microvascular Res*, ce a inclus 275 de pacienți cu SScl. Un studiu recent, publicat în *Int J Rheum Dis.*, în 2012, ce a inclus 22 de pacienți cu SScd și 20 de pacienți cu SScl, a relevat o corelație negativă, puternică, semnificativă statistic, între scorul Rodnan modificat și densitatea capilară constatată la examenul capilaroscopic. În mod similar analiza corelațiilor în cadrul lotului nostru, a relevat o corelație pozitivă, moderată, cu un coeficient de corelație Spearman de 0.524, semnificativ statistic, $p=0.004$, între mRSS și pattern-ul capilaroscopic.

Studiile de specialitate arată că, din punct de vedere histopatologic, sclerodermia sistemică se caracterizează prin afectare vasculară și fibroză extensivă la nivelul pielii și a organelor interne (cord, plămân, tract gastro-intestinal), cu depunerea unei cantități de colagen. Proporția relativă a două tipuri majore de procolagen al pielii, tipurile I și III, este mai mare în cazul

leziunilor de scleroză sistemică comparativ cu subiecții sănătoși. În lotul nostru de pacienți cu SSc, la examenul histopatologic pe colorația uzuală hematoxilină-eozină, s-au constatat o serie de modificări microscopice în funcție de severitatea leziunilor. Astfel, în stadiul inflamator incipient în dermul reticular s-a identificat un infiltrat inflamator limfo-plasmocitar dispus printre fibrele colagene îngoșate. În stadiul inflamator intermediar, infiltratul inflamator a fost prezent în jurul glandelor sudoripare exocrine și s-a asociat cu benzi colagene groase și reducerea numărului de adipocite periglandulare. În stadiul sclerotic tardiv, infiltratul inflamator a fost absent sau redus la nivelul dermului și focal prezent la nivelul hipodermului. În dermul reticular s-au identificat fibre colagene groase, intens eozinofile, dispuse în benzi grupate. Glandele sudoripare exocrine au fost atrofice, înconjurate de fibre colagene nou formate și de foarte rare adipocite.

În ceea ce privește lotul de pacienți cu **boală lupică**, afecțiune ce recunoaște o predominanță a sexului feminin, observație atribuită, în parte, efectului estrogenic, fapt sugerat de numeroase observații raportate de studiile publicate în literatura de specialitate, incluzând raportul bărbați-femei la diferite categorii de vârstă: în copilărie, unde influența hormonală este minimă, raportul pe sexe este de 3:1, la adulți, în perioada fertilă a sexului feminin, variază între 7:1 și 15: 1, pentru ca după menopauză, raportul să fie de aproximativ 8:1. În cadrul lotului nostru de 31 de pacienți cu LES am înregistrat o predominanță a sexului feminin (29 vs 2), date concordante cu cele publicate anterior.

Semnificația afectării vasculare la pacienții cu LES, prototipul bolilor autoimune, a fost demonstrată încă din 1904, de către Osler et al, și este bine stabilit faptul că disfuncția endotelială, *primum movens* în procesul de remodelare vasculară reprezintă primul situs al afectării multisistemice la acești pacienți.

Prin utilizarea capilaroscopiei periunghiale, o metodă sigură, reproductibilă, utilă în evaluarea modificărilor microvasculare *in vivo*, la pacienții cu afecțiuni conjunctivo-vasculare imun mediate, se pot surprinde eventualele modificări precoce, în vederea aprecierii gradului de extensie sistemică a afecțiunii. %. În cadrul lotului nostru am identificat modificări la 29 dintre cei 31 de pacienți cu LES și la 5 din cei 16 pacienți cu LESA. Procentul descris în studiile publicate anterior variază între 75%, într-un grup de 40 de pacienți studiați de Ragab et al în 2011, 76.7% într-un studiu ce a inclus 33 de subiecți, publicat în An Bras Dermatol, (by Facina

et al in 2006) la 95.5% (Kurylczyn-Moskal et al, in 2007). Diferențele procentuale între diverse rapoarte publicate anterior pot fi explicate prin durata diferită a duratei bolii în cadrul loturilor incluse. Cele mai frecvente au fost reprezentate de capilare cu o tortuozitate crescută (25; 86.20%), capilare dilatate (17; 54.83%), capilare alungite (15; 5.61%), un plex subpapilar proeminent la 18 pacienți (58.06%) și un pattern scleroderma like, cu hemoragii, capilare ramificate și arii avasculare la 5 pacienți, rezultate similare cu procentele raportate de literatura de specialitate. Analiza inter-relației modificărilor capilaroscopice cu scorul de activitate al bolii, cuantificat prin intermediul SLEDAI, a relevat următoarele date:

	Coeficientul de corelație Spearman	p
Tortuozitate crescută	0.490	0.0001
Capilare alungite	0.816	<0.0001
Capilare dilatate	0.726	0.020
Plex subpapilar proeminent	0.546	0.008
Pattern scleroderma-like	0.069	0.757

Mai mult decât atât, am încercat să stabilim dacă anumite modificări capilaroscopice pot prezice o afectare mai severă, persistent activă (SLEDAI>3) și astfel am împărțit grupul de studiu în două loturi, în funcție de SLEDAI, și am analizat influența acestuia asupra modificărilor microvascularizației periferice.

	p	Specificitate (%) (IC95%)	Sensibilitate (%) (IC95%)	PPV (%) (IC95%)	NPV (%) (IC95%)
Tortuozitate crescută	0.028	100 (0.397-1.000)	66.67 (0.409- 0.866)	100 (0.735-1.000)	40 (0.121-0.737)
Capilare alungite	<0.0001	100 (0.691- 1.000)	85.71 (0.571-0.982)	100 (0.735-1.000)	83.33 (0.515-0.979)
Capilare dilatate	0.0007	100 (0.590- 1.000)	80 (0.519- 0.956)	100 (0.735-1.000)	70 (0.347-0.933)
Plex subpapilar proeminent	0.074	60 (0.322- 0.836)	85.71 (0.421- 0.996)	50 (0.210- 0.789)	90 (0.555- 0.997)
Pattern scleroderma-like	0.933	47.37 (0.244- 0.711)	66.67 (0.094- 0.991)	16.67 (0.020- 0.484)	90 (0.555- 0.997)

În plus, am sesizat o diferență semnificativă statistic între titrul ac anti-ADNdc la pacienții cu/fără anumite modificări capilaroscopice:

Modificări capilaroscopice	Ac anti-ADNdc (media±SD) UI/ml	p
Tortuozitate crescută+	361.55±243.69	0.0007
Tortuozitate crescută-	147.15±43.55	
Capilare alungite+	415.2±68.18	0.0180
Capilare alungite-	155±34.14	
Capilare dilatate+	415.22 ±245.80	0.0024
Capilare dilatate-	155.04+83.66	
Plex subpapilar proeminent+	400.48 ± 198.07	0.05
Plex subpapilar proeminent-	286.21±243.59	

În general erupția maculară din lupus se însoțește de modificări histologice discrete care au condus la denumirea de „dermatoză invizibilă„. În studiul nostru dermul a prezentat aspecte de mucinoză vizibilă chiar pe colorația uzuală ca globule sau ca „mărgele„, bazofile dispuse printre fibrele colagene. De asemenea, unele cazuri au prezentat extravazări ale eritrocitelor și ectazii vasculare în dermul superficial. În unele cazuri cu leziuni vechi de LES, aspectul microscopic a evidențiat modificări asemănătoare cu cele ce se remarcă în lupusul eritematos subacut cutanat: degenerescență hidropică evidentă a stratului bazal, cu incontineță pigmentară și edem, hematii extravazate și intens infiltrat inflamator cu mononucleate în dermul superficial.

La lotul cu **dermatomiozită**, evaluarea microvascularizației periferice prin intermediul capilaroscopiei periunghiale la la pacienții cu DM incluși în studiu a evidențiat modificări la 18 dintre aceștia (90%), reprezentate de dezorganizarea rețelei capilare, amprenta neoangiogenezei, la 10 dintre pacienți (55.55%), anse capilare dilatate la 10 (55.55%), capilare ramificate la 11 (61.11%), microhemoragii la 11 subiecți (61.11%), și scăderea densității capilare, cu arii avasculare la 9 pacienți (50%).

Analiza corelațiilor prezenței anumitor modificări capilaroscopice cu variabilele pacienților a identificat, pentru durata bolii, o corelație puternică, negativă, cu un coeficient de corelație Spearman de -0.817, cu prezența dezorganizării rețelei capilare, o corelație pozitivă cu

prezența capilarelor ramificate ($r=0.865$), semnificativă statistic, $p<0.0001$, și o corelație negativă, cu prezența microhemoragiilor, a capilarelor dilatate și a ariilor avasculare. Similar datelor recente publicate în *Clinical Rheumatology*, consecutive unui studiu ce a inclus 29 de pacienți cu DM, și la lotul studiat, ariile avasculare și prezența capilarelor dilatate a fost corelată cu o durată mai scurtă a bolii.

	Dezorganizarea rețelei capilare	Capilare ramificate	Microhemoragii	Capilare dilatate	Arii avasculare
r	-0.817	0.865	-0.778	-0.817	-0.795
p	<0.0001	<0.0001	0.02	0.001	<0.0001
IC 95%	-0.927-0.578	0.678- 0.947	-0.910-0.501	-0.927-0.578	-0.918 - 0.535

Studiul histologic al fragmentelor de *biopsie cutanată* a evidențiat o serie de modificări nespecifice, caracterizate de o *dermatită de interfață* cu infiltrat limfocitar în dermul superficial și cu leziuni degenerative sau chiar necrotice ale keratinocitelor bazale. Modificările microvascularizației cutanate identificate în studiul de față, au fost reprezentate de ectazii vasculare, hiperplazie intimală, injurii endoteliale, tromboze ocluzive și necroze fibrinoide al capilarelor dermice.

Principala caracteristică histopatologică pe *biopsiile musculare* la pacienții cu DM este reprezentată de miofibrilele degenerate și atrofice dispuse perifascicular, care rezultă din distrugerea capilarelor din această regiune, cu hipoxie consecutivă. Comparativ cu datele publicate de studiile de specialitate, în lotul nostru cu DM, biopsiile musculare pe colorația uzuală au relevat existența atrofiei perifasciculare a fibrelor musculare striate, cu nuclei hipertofici și, uneori, cu internalizarea intracitoplasmatică a nucleilor. Pe alocuri fibrele musculare au prezentat leziuni de tip degenerativ cu vacuolizări citoplasmice sau cu stergerea stratiilor transversale și leziuni de tip necrotic. La distanța de fibrele musculare atrofice, la nivelul perimisiumului și uneori a endomisiumului s-a evidențiat un infiltrat inflamator limfocitar dispus perivascular. Vasele sanguine din zonele de atrofie perifasciculară au fost reduse numeric și au prezentat pe alocuri endotelii turgescențe și lumen redus. Vasele sanguine situate în vecinătatea zonelor de atrofie a fibrelor musculare au fost pe alocuri dilatate. În formele cronice fibroza a înlocuit parțial infiltratul inflamator.

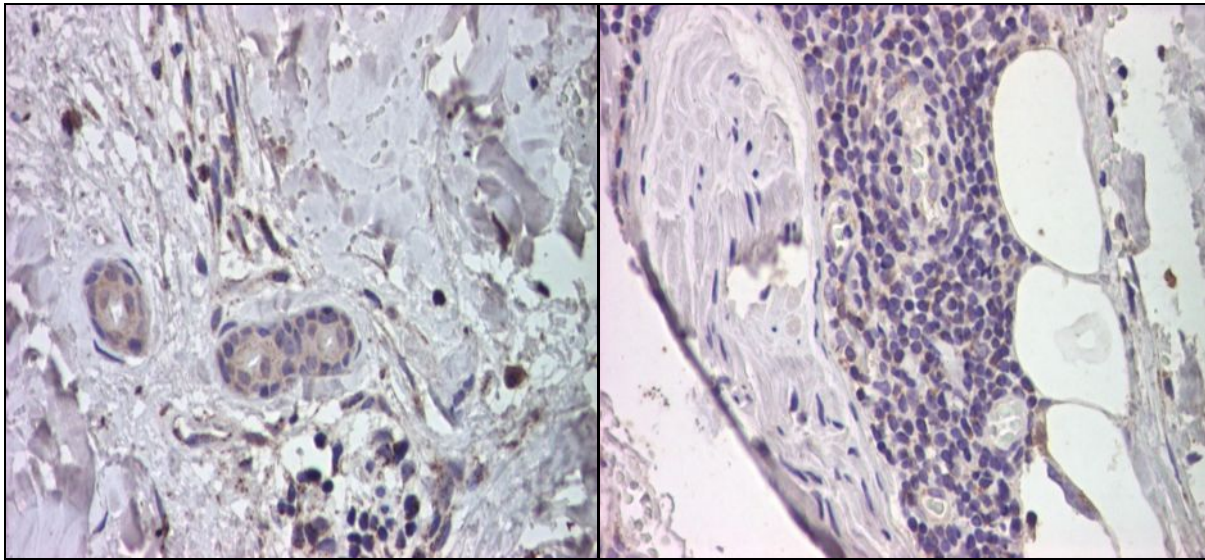
Studiul imunohistochimic

În legătură cu MMP, este cunoscut faptul că acestea sunt produse de celule ale țesutului conjunctiv și celule inflamatorii, fibroblaste, celule endoteliale, osteoblaste, macrofage, limfocite și neutrofile și sunt responsabile de injuria tisulară în condiții de inflamație acută și cronică, de modificările tegumentare care apar ca o consecință a procesului natural de îmbătrânire și ca urmare a expunerii acute la ultraviolete și de asemenea de interesarea și lezarea țesutului conjunctiv în timpul determinărilor tumorale. Majoritatea MMP-urilor sunt secretate ca proteine inactive și sunt activate în urma scindării de către proteazele extracelulare și degradează colagenul de tip IV și V și alte proteine ale MEC. Analiza imunomarcajului la **MMP 3** la lotul martor a evidențiat un marcaj cu intensitate moderată și mare la nivelul celulelor epiteliale ale glandelor sudoripare, și un marcaj foarte discret (slab) și în rare celule, la nivelul keratinocitelor epidermice, celulelor endoteliale și a celulelor fibroblasto-fibrocitare dermice. Analiza imunomarcajului la MMP 9 la lotul martor a evidențiat absența acestuia în keratinocitele epidermice, celulele fibroblasto-fibrocitare dermice și pozitivitate focală cu intensitate moderată și mare în celulele epiteliale ale glandelor sudoripare și foarte slabă în celulele endoteliale.

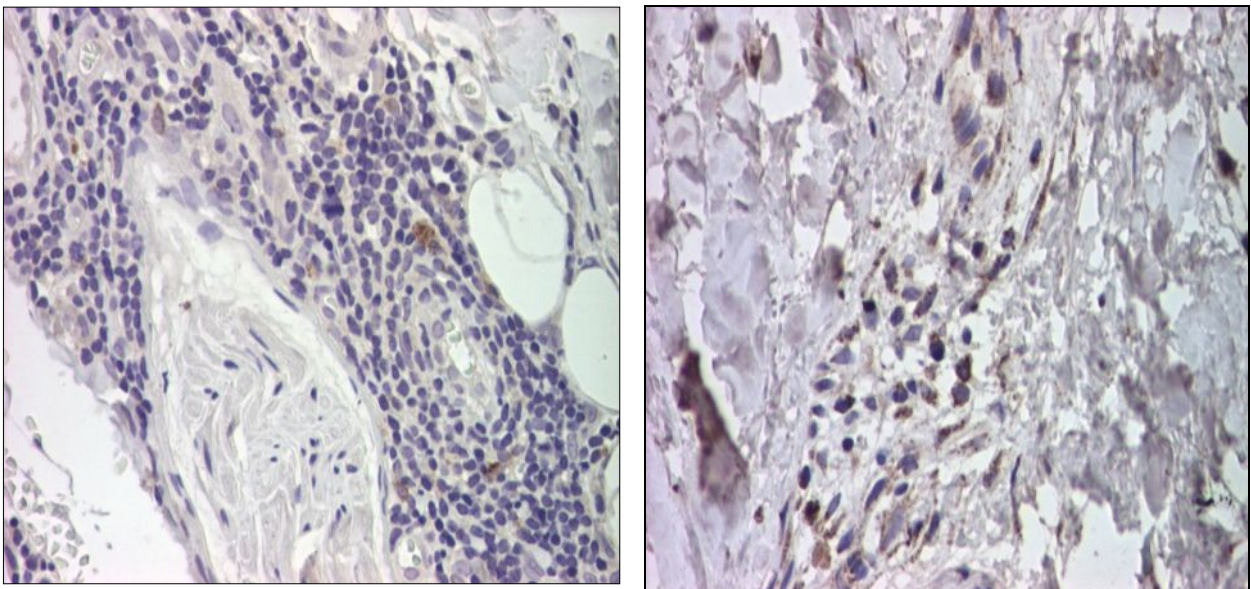
Analiza imunomarcajului la MMP-3 și 9 la pacienții lotului cu SSc din studiul de față a evidențiat că celulele care au exprimat cel mai frecvent și mai intens atât MMP-3 și MMP-9 au fost fibrociții și fibroblaștii. Aceștia au prezentat un marcaj citoplasmatic intens la ambele MMP. Celulele inflamatorii limfocitare au prezentat marcaj intens, dar în rare elemente, în timp ce celulele epiteliale ale glandelor sudoripare au exprimat doar MMP-3, cu intensitate moderată și slabă și pattern difuz citoplasmatic. Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele publicate anterior, care au arătat că fibroblaștii pacienților cu SSc prezintă o concentrație crescută de MMP comparativ cu indivizii sănătoși. La pacienții cu SSc, MMP-urile au fost mai intens exprimate comparativ cu lotul martor, la nivelul celulelor fibroblasto-fibrocitare, mai slab exprimate la nivelul celulelor glandelor sudoripare și similar exprimate la nivelul keratinocitelor.

Producția de MMP-uri de către keratinocite poate juca un rol important în ***lupusul*** eritematos cutanat. MMP-urile sunt enzime care degradează componentele MEC și ale membranelor bazale. Studiul nostru a arătat o creștere a expresiei MMP-3 în keratinocite și absența MMP-9 la acest nivel la pacienții cu LES. rezultatele au fost similare cu cele publicate, un aspect particular al imunomarcajului la MMP-3 fiind reprezentat de pozitivitatea acestui marker la nivelul keratinocitelor epidermice. Aceste celule au prezentat un marcaj cu intensitate

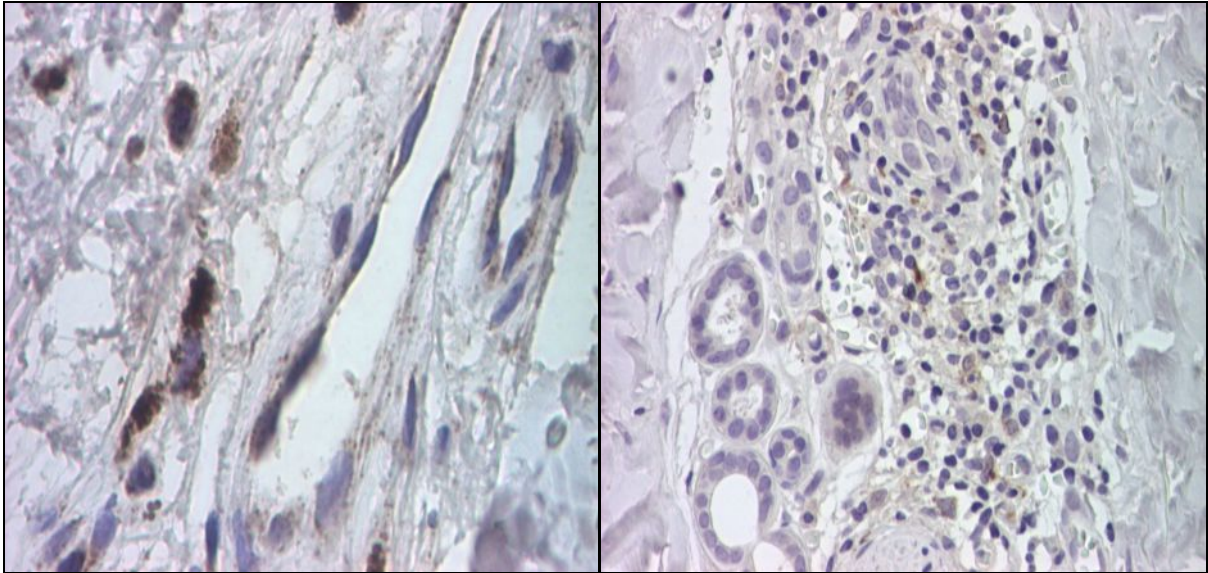
mare și pattern sub formă de granule mari intracitoplasmatic. În plus glandele sudoripare au prezentat marcaj intens la ambele MMP studiate, acestea fiind prezente în fibroblaști, fibrocite, macrofage și celulele dendritice dermice. Ca aspecte particulare, celulele infiltratului inflamator au fost negative la ambele metaloproteinaze, iar MMP-9 a marcat intens endoteliile vaselor sanguine din dermul superficial.



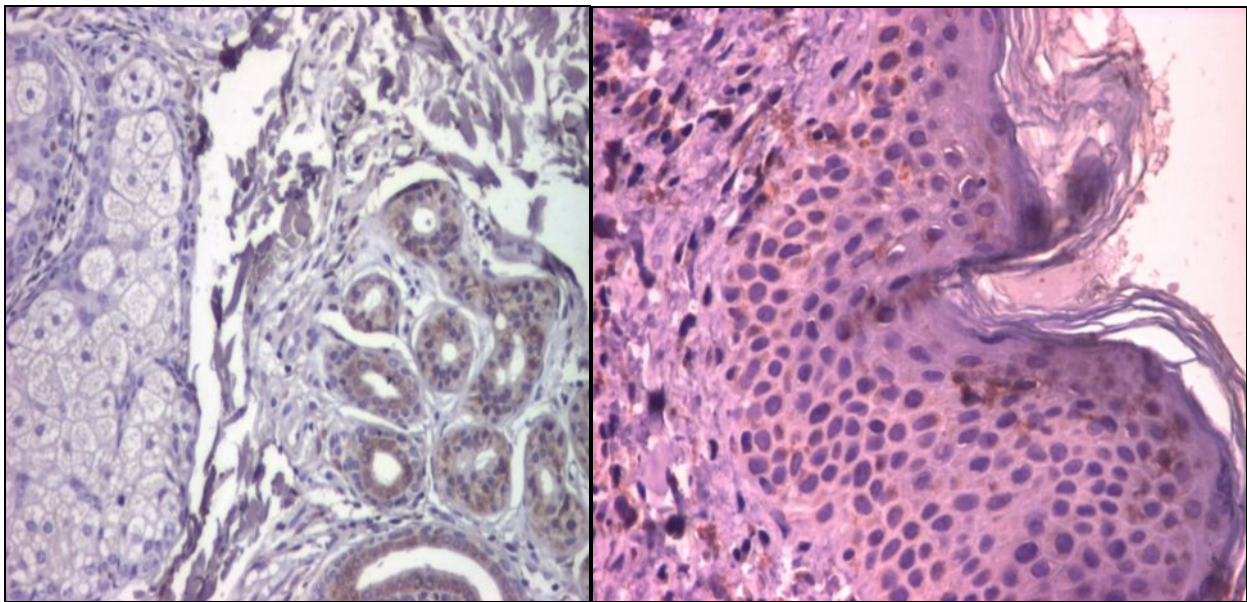
SSc:a. MMP 3 slab exprimat în glandele sudoripare X100; b. MMP 3 intens în frecvente celule din infiltratul inflamator (magnificație x100)



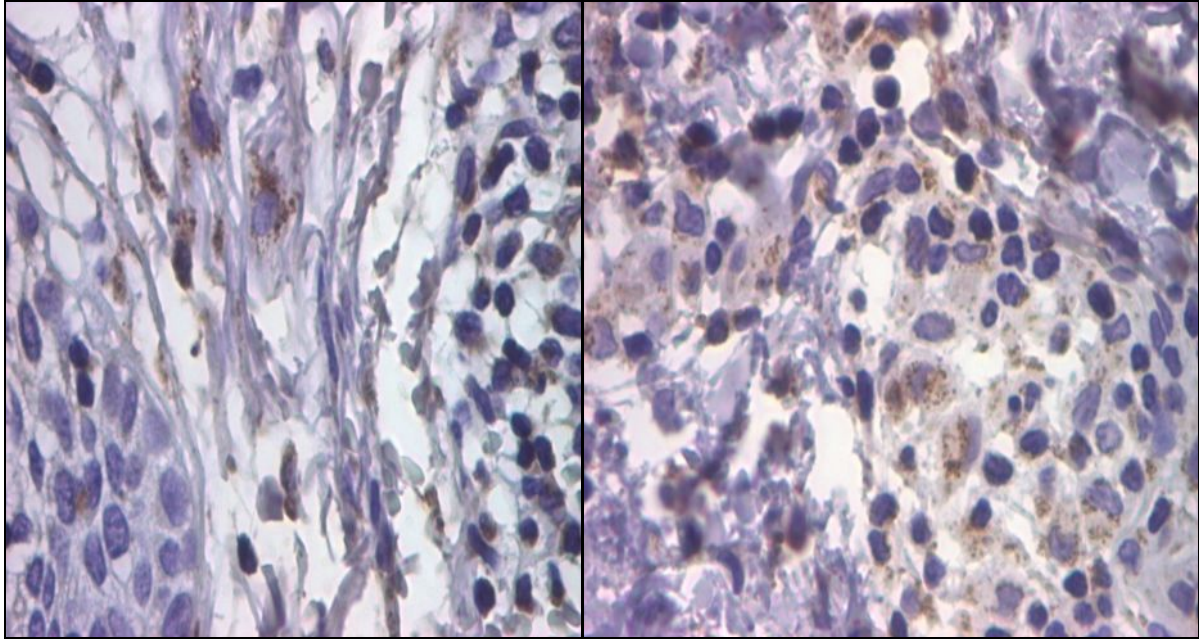
SSc:a.MMP 3 moderat reprezentat in infiltratul inflamator (limfocite) X200; b. MMP 9 intens exprimat în rare celule infiltratul inflamator perineural, x1000



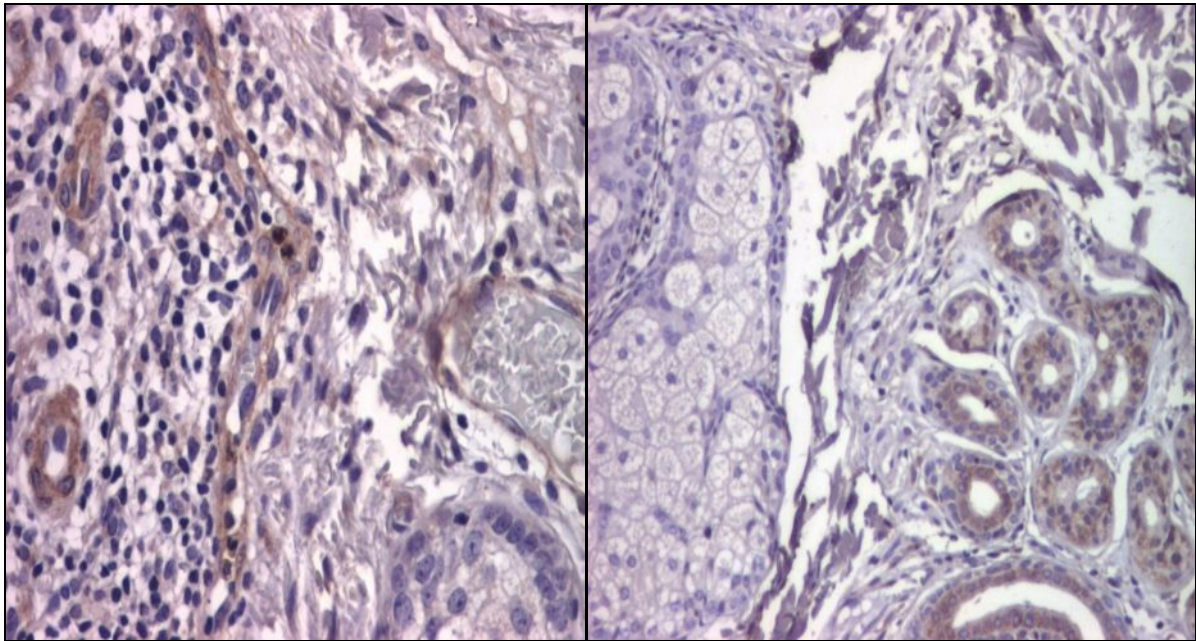
SSc: a.MMP 9 intens exprimat la nivelul fibroblaștilor și celulelor endoteliale X400; b.MMP9 negativ în glandele sudoripare, x100



LES: a. MMP 3 intens exprimat în glandele sudoripare (magnificație x 100); b.MMP 3 pozitiv intens în keratinocite epidermice, (magnificație x200)



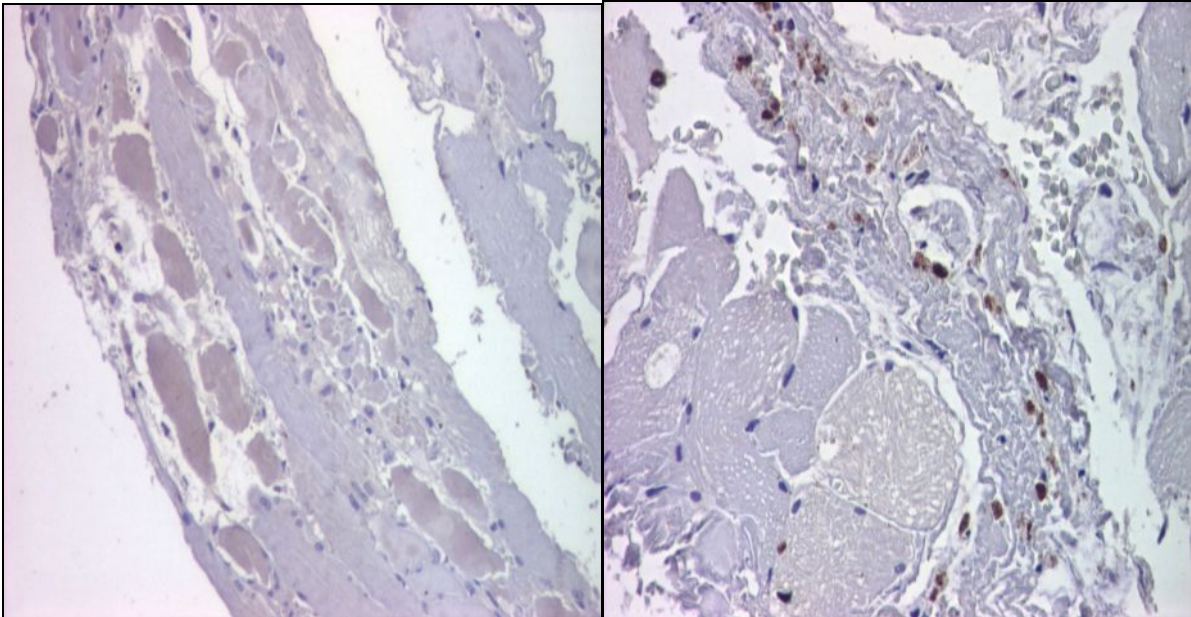
LES a. MMP 3 intens exprimat pozitiv în fibroblaste (magnificație X400) ; b.MMP3 în fibrocite, celule dendritice, macrofage (magnificație x400)



LES : a. MMP 9 Intens exprimat în pereții vaselor de sânge, negativ în limfocite, (magnificație x200) ; b.MMP 9 intens exprimat în glandele sudoripare (magnificație x100)

Referitor la *miopatiile inflamatorii*, într-un studiu, efectuat de Schoser et al, MMP-9 a fost puternic exprimat în miofibrilele atrofile din toate aceste afecțiuni. Conform unor studii efectuate prin PCR, MMP-9 este semnificativ crescută în PM și DM și într-o proporție mai mică în miozita cu corpi de incluziune, în timp nivelul de exprimare al TIMP a rămas neschimbat în comparație cu lotul martor.

În studiul de față, la pacienții lotului cu DM, analiza imunomarcajului la MMP-3 și MMP-9 a evidențiat că infiltratul inflamator limfocitar a prezentat marcaj MMP-3 și 9 intens, fibrele musculare striate lezate au avut exprimat atât MMP-3 cât și MMP-9, cu intensitate mai mare la MMP-3. Ambele MMP au fost negativ în fibrele musculare normale la pacienții cu DM și PM. Vasele sanguine au fost pozitive la ambele MMP, cu intensitate moderată la nivelul miocitelor netede din tunica medie. Astfel, imunohistochimic MMP-9 pare să fie exprimat în special la nivelul limfocitelor din infiltratul inflamator și mai puțin în sarcoplasma fibrelor musculare striate degenerate, în timp ce MMP-3 se exprimă intens atât în limfocite cât și în sarcolema fibrelor musculare striate alterate la pacienții cu DM și PM. Comparativ cu lotul martor, pacienții cu DM au prezentat un imunomarcacaj mai intens în elementele celulare analizate.



DM: a. Imunomarcaj MMP 9 cu intensitate moderată în infibrele musculare atrofile (magnificație x100); b. Imunomarcaj MMP 9 intens în infiltratul inflamator (magnificație X 200)

Comparând rezultatele obținute pe cele trei loturi de studiu cu rezultatele obținute la lotul martor, în urma imunomarcajului cu MMP-3 și 9, se poate concluziona că: MMP-urile au fost similar exprimate la pacienții loturilor de studiu comparativ cu lotul sănătos în glandele sudoripare, cu excepția lotului cu SSc, care a exprimat mult mai slab aceste MMP-uri; de asemenea, MMP-urile au tendință de pozitivare în epidermul degenerat al pacienților cu LES și DM, în timp ce celulele fibroblasto-fibrocitare, endoteliale și cele limfocitare exprimă foarte intens MMP comparativ cu lotul control, cu excepția pacienților cu LES ale căror limfocite celulare sunt negative la imunomarcajul cu MMP-3 și 9. Pe biopsiile musculare la lotul cu DM s-a remarcat în plus o expresie crescută a acestor MMP la nivelul celulelor musculare striate afectate dar și a celor musculare netede din pereții vasculari.

Imunoexpresia MMP în diferite tipuri de celule la loturile de studiu comparativ cu lotul martor

		Celule fibrocitare	Limfocite	Celule endoteliale	Keratinocite	Glande sudoripare
LOT MARTOR	MMP 3	+	nu e cazul	+	+	++/+++
	MMP 9	-	nu e cazul	+	-	++/+++
ScS	MMP 3	+++	+++	+	-	+
	MMP 9	+++	+++	+++	-	-
LES	MMP 3	+++	-	+	+++	++/+++
	MMP 9	+++	-	+++	-	++/+++
DM-biopsie tegumentară	MMP 3	+++	+++	+	+ / ++	++/+++
	MMP 9	++/+++	-	+	- / +	+ / ++
DM/PM biopsie musculară	MMP 3	++/+++	+++	++	nu e cazul	nu e cazul
	MMP 9	++/+++	+++	++/+++	nu e cazul	nu e cazul

CONCLUZII

- Manifestările cutanate reprezintă un element diagnostic esențial în practica curentă, iar evoluția pattern-ului cutanat reprezintă un indicator al activității de boală, direct inter-relaționate cu aceasta și, implicit, cu severitatea extensiei sistemice și afectarea de organ.
- Manifestările cutanate pot fi specifice, patognomonice pentru o anumită afecțiune, și sunt însoțite de aspecte histo-patologice tipice, dar de cele mai multe ori, aspectul cutanat al bolilor conjunctivo-vasculare imun-mediate este variat, asociind leziuni specifice și non-specifice, și reprezintă indicatori diagnostici esențiali în practica curentă.
- Evaluarea manifestărilor cutanate ale pacienților cu SSc din cohorta studiată, atât cu SScd cât și cu SScl, a relevat prezența sindromului Raynaud la întreg lotul, a telangiectaziilor la peste 2/3 dintre pacienți și a ulcerărilor digitale la peste jumătate dintre aceștia.
- Explorarea capilaroscopică, esențială pentru aprecierea modificărilor microvascularizației la pacienții cu SSc, a identificat prezența pattern-ului de tip „early” la aproximativ 40% dintre cazuri, atât pentru forma limitată, cât și pentru cea difuză, “active pattern” la aproximativ 46%, iar “late pattern” la 1 pacient cu SScd și la 4 cu SScl.
- Prezența ulcerărilor digitale s-a corelat cu pattern-ul capilaroscopic de tip activ iar prezența telangiectaziilor a fost constatată, de asemenea, în procent semnificativ statistic mai mare la acești pacienți.
- Scorul Rodnan modificat, utilizat pentru evaluarea extensiei afectării cutanate, s-a corelat negativ cu densitatea capilară constatată la examenul capilaroscopic.
- Analiza inter-relațiilor dintre prezența manifestărilor cutanate și modificările histo-patologice a identificat că pacienții cu ulcerății digitale au prezentat în proporție semnificativ mai mare atrofie totală a anexelor.
- Manifestările cutanate și mucoase apar, la un anumit moment al evoluției, la peste 80% dintre pacienți cu lupus și sunt extrem de numeroase, de la clasicul rash malar până la leziuni fixe, ce pot fi asociate cu cicatrici și atrofie.
- Prin utilizarea capilaroscopiei periunghiale, am identificat modificări la majoritatea pacienților cu LES și la o treime dintre cei cu LESA; cele mai frecvente au fost reprezentate de capilare cu o tortuozitate crescută, capilare dilatate, capilare alungite și un plex subpapilar proeminent.
- Analiza inter-relației modificărilor capilaroscopice cu scorul de activitate al bolii, cuantificat prin intermediul SLEDAI, a relevat o corelație pozitivă, semnificativă statistic, pentru prezența capilarelor alungite, creșterea tortuozității capilarelor și un plex subpapilar proeminent și prezența capilarelor dilatate
- Evaluarea microvascularizației periferice prin intermediul capilaroscopiei periunghiale la pacienții cu DM incluși în studiu a evidențiat modificări la 18 dintre aceștia (90%),

reprezentate de dezorganizarea rețelei capilare, amprenta neoangiogenezei, anse capilare dilatate, capilare ramificate, microhemoragii și scăderea densității capilare, cu arii avasculare; ariile avasculare și prezența capilarelor dilatate a fost corelată cu o durată mai scurtă a bolii.

- La pacienții cu DM, biopsiile musculare pe colorația uzuală au relevat existența atrofiei perifasiculare a fibrelor musculare striate, cu nuclei hipertofici și, uneori, cu internalizarea intracitoplasmatică a nucleilor iar la nivelul perimisiumului și uneori a endomisiumului s-a evidențiat un infiltrat inflamator limfocitar dispus perivascular
- Studiul imunohistochimic a identificat o tendință de pozitivare a MMP-3 și MMP-9 în epidermul degenerat al pacienților cu LES și DM comparativ cu lotul martor. Celulele fibroblasto-fibrocitare, endoteliale și cele limfocitare exprimă foarte intens MMP 3 și MMP 9 comparativ cu lotul control, cu excepția pacienților cu LES ale căror limfocite sunt negative la aceste metaloproteinaze.
- La pacienții cu SSc, MMP-3 și MMP-9 sunt cel mai intens exprimate de către fibrociți și fibroblaști. Producția crescută de MMP-3 și MMP-9 de către fibroblaștii dermului sugerează că aceste matrixmetaloproteinaze au un rol important în progresia fibrozei cutanate la pacienții cu sclerodermie sistemică, cel mai probabil prin reducerea degradării colagenului datorită insuficienței activării MMP-urilor secretate.
- La pacienții cu lupus, ca aspect particular, MMP-3 se exprimă intens keratinocitele epidermice sugerând implicarea acestei matrixmetaloproteinaze în medierea modificărilor de la nivel epidermic pe lângă implicarea ei în remodelarea tisulară dermică.
- Supraexpresia MMP-3 și 9 la nivelul glandelor sudoripare, endoteliilor vasculare, celulelor fibroblasto-fibrocitare, macrofagelor și chiar a keratinocitelor (MMP 3) la pacienții cu LES, arată că tegumentul este supus unor acțiuni proteolitice intense și sugerează că beneficiile utilizării inhibitorilor de MMP pentru reducerea leziunilor tisulare la acești pacienți sunt majore.
- Imunohistochimic MMP-3 și MMP-9 par să fie exprimate în special la nivelul limfocitelor din infiltratul inflamator la pacienții cu DM, sugerând rolul acestor celule inflamatorii în injuria musculară.
- Prezența imunoexpresiei MMP-3 și MMP-9 la nivelul fibrelor musculare degenerate poate fi un eveniment important în procesul patogenic din DM și poate avea un rol important în dezvoltarea unor noi strategii terapeutice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Wirz EG, Jaeger VK, Allanore Y, Riemekasten G, Hachulla E, Distler O, Airò P, Carreira PE, Tikly M, Vettori S, Balbir Gurman A, Damjanov N, Müller-Ladner U, Distler J, Li M, Häusermann P, Walker UA; EUSTAR coauthors. Incidence and predictors of cutaneous manifestations during the early course of systemic sclerosis: a 10-year longitudinal study from the EUSTAR database. *Ann Rheum Dis*. 2015
2. Tiev KP, Diot E, Clerson P, Dupuis-Siméon F, Hachulla E, Hatron PY, Constans J, Cirstéa D, Farge-Bancel D, Carpentier PH. Clinical features of scleroderma patients with or without prior or current ischemic digital ulcers: post-hoc analysis of a nationwide multicenter cohort (ItinérAIR-Sclérodermie). *JRheumatol*. 2009 Jul; 36(7):1470-6
3. Caramaschi P, Martinelli N, Volpe A, Pieropan S, Tinazzi I, Patuzzo G, Mahamid H, Bambara LM, Biasi D. A score of risk factors associated with ischemic digital ulcers in patients affected by systemic sclerosis treated with iloprost. *Clin Rheumatol*. 2009 Jul;28(7):807-13
4. Xu D, Li MT, Hou Y, Wang Q, Hu CJ, Song N, Zhao JL, Zeng XF, Zhang FC. Clinical characteristics of systemic sclerosis patients with digital ulcers in China. *Clin Exp Rheumatol*. 2013 Mar-Apr; 31(2 Suppl 76):46-9.
5. Khimdas S, Harding S, Bonner A, Zummer B, Baron M, Pope J; Canadian Scleroderma Research Group. Associations with digital ulcers in a large cohort of systemic sclerosis: results from the Canadian Scleroderma Research Group registry. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011 Jan;63(1):142-9.
6. Bhakuni DS, Vasdev V, Garg MK, Narayanan K, Jain R, Mullick G. Nailfold capillaroscopy by digital microscope in an Indian population with systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis*. 2012 Feb;15(1):95-101.
7. Lambova S, Müller-Ladner U. Capillaroscopic findings in systemic sclerosis -- are they associated with disease duration and presence of digital ulcers? *Discov Med*. 2011 Nov;12(66):413-8.
8. Cutolo M, Pizzorni C, Tuccio M, Burrioni A, Craviotto C, Basso M, Serio B, Sulli A. Nailfold videocapillaroscopic patterns and serum autoantibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Jun;43(6):719-26.
9. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:71.

10. Reveille JD, Solomon DH, American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 49:399.
11. Vermeersch P, Bossuyt X. Prevalence and clinical significance of rare antinuclear antibody patterns. *Autoimmun Rev* 2013; 12:998.
12. Khimdas S1, Harding S, Bonner A, Zummer B, Baron M, Pope J; Canadian Scleroderma Research Group. Associations with digital ulcers in a large cohort of systemic sclerosis: results from the Canadian Scleroderma Research Group registry. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011 Jan;63(1):142-9. doi: 10.1002/acr.20336.
13. Tiev KP, Diot E, Clerson P, Dupuis-Siméon F, Hachulla E, Hatron PY, Constans J, Cirstéa D, Farge-Bancel D, Carpentier PH. Clinical features of scleroderma patients with or without prior or current ischemic digital ulcers: post-hoc analysis of a nationwide multicenter cohort (ItinérAIR-Sclérodermie). *J Rheumatol*. 2009 Jul;36(7):1470-6
14. Nitsche A1. Raynaud, digital ulcers and calcinosis in scleroderma. *Reumatol Clin*. 2012 Sep-Oct;8(5):270-7. Epub 2012 Jul 25.
15. Ghizzoni C, Sebastiani M, Manfredi A, Campomori F, Colaci M, Giuggioli D, Ferri C. Prevalence and evolution of scleroderma pattern at nailfold videocapillaroscopy in systemic sclerosis patients: Clinical and prognostic implications. *Microvasc Res*. 2015 May;99:92-5.
16. Sulli A, Ruaro B, Smith V, Pizzorni C, Zampogna G, Gallo M, Cutolo M. Progression of nailfold microvascular damage and antinuclear antibody pattern in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2013 May;40(5):634-9.
17. Arana-Ruiz JC1, Silveira LH1, Castillo-Martínez D2, Amezcua-Guerra LM3,4,5. Assessment of nailfold capillaries with a handheld dermatoscope may discriminate the extent of organ involvement in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2015 Nov 11. [Epub ahead of print]
18. Bhakuni DS, Vasdev V, Garg MK, Narayanan K, Jain R, Mullick G. Nailfold capillaroscopy by digital microscope in an Indian population with systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis*. 2012 Feb;15(1):95-101. doi: 10.1111/j.1756-185X.2011.01699.x. Epub 2011 Dec 4.
19. Richter JG1, Sander O, Schneider M, Klein-Weigel P. Diagnostic algorithm for Raynaud's phenomenon and vascular skin lesions in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2010 Aug;19(9):1087-95.
20. Manfredi A, Sebastiani M, Cassone G, Pipitone N, Giuggioli D, Colaci M, Salvarani C, Ferri C. Nailfold capillaroscopic changes in dermatomyositis and polymyositis. *Clin Rheumatol*. 2015 Feb;34(2):279-84.
21. Vattemi G, Mirabella M, Guglielmi V, Lucchini M, Tomelleri G, Ghirardello A, Doria A. Muscle biopsy features of idiopathic inflammatory myopathies and differential diagnosis. *Auto Immun Highlights*. 2014 Sep 10;5(3):77-85.