

INDICE

Summary.....	pag. 2
Riassunto.....	pag. 4
Instabilità cromosomica e apoptosi nei linfociti di pazienti affetti da sclerosi sistemica.....	pag. 6
Resistenza alla proteina C attivata nella sindrome da anticorpi antifosfolipidi.....	pag. 34
Influenza dei diversi valori di cut-off degli anticorpi anticardiolipina di classe G sulla diagnosi di sindrome da anticorpi antifosfolipidi.....	pag. 50
Significato clinico degli anticorpi anti acido lisobisfosfatidico nei pazienti con sindrome da antifosfolipidi primaria.....	pag. 65

SUMMARY

This thesis, carried out in the Thrombosis and Haemostasis laboratory of the University Medical Center of Utrecht and the Laboratory of Genetics + the Laboratory of the Immunopathology, of the Rheumatology Unit, the latter two of the of University Padua, refers to studies on two topics: the first concerns Systemic sclerosis (SSc) and the second antiphospholipid syndrome (APS).

The aims of the study were initially to investigate the clastogenic effect on DNA, confirmed by the presence of micronuclei (MN) (the protective cellular mechanisms normally used to stabilize DNA breaks), and the frequency of apoptosis in patients with systemic sclerosis (SSc). We then analyzed the effect of utilizing two cut-off values when anticardiolipin antibodies are being classified and the clinical significance of anti lysobisphosphatidic acid (LBPA) antibodies.

The results obtained in patients with SSc demonstrated that there is a higher frequency of MN only in the anticentromere (ACA) and antitopoisomerase I (ATA) antibody positive patients. There is, moreover, a clastogenic effect on DNA and an interference in the protective cellular mechanisms normally stabilizing DNA breaks in both groups of patients. The presence of apoptotic cells in cultures of circulating lymphocytes was investigated using the TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling) technique. The mean frequency of apoptotic lymphocytes was statistically higher in the anti RNA polymerase III (ARA) positive patients than in the control population and ACA and ATA positive patients. According to these data, it would see that the lymphocytes of ARA patients are more prone to apoptosis than those of ACA and ATA patients, probably due to a different type of cell damage or to a different perception of cell damage in ACA, ATA, and ARA positive subjects.

Our studies on protein C (APC) resistance in APS demonstrated that phospholipid binding is not essential to generate APC resistance in APS.

With reference to our studies on anticardiolipin antibody cut-off values, we found that the 99th percentile seems more sensitive than the >40 GLP units value for APS classification as it includes subjects with aCL positivity alone as well as patients with pregnancy morbidity.

Finally, the clinical value of anti-LBPA antibodies in patients with primary APS was evaluated and on the basis of our results we cannot define it a further marker for APS diagnosis and in differentiating the clinical and laboratory subsets of this disease.

RIASSUNTO

La tesi comprende due tipi diversi di ricerca: uno riguardante la sclerosi sistemica (SSc) e l'altro la sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS). Il lavoro è stato svolto in parte presso il "Thrombosis and Haemostasis laboratory of the University Medical Center of Utrecht", in parte presso il laboratorio di Genetica dell'Università di Padova e principalmente presso il laboratorio di Immunopatologia della Cattedra di Reumatologia dell'Università di Padova.

Inizialmente lo scopo dello studio è stato quello di approfondire alcuni aspetti genetici della SSc come la formazione di micronuclei (MN), le rotture instabili del DNA e l'apoptosi dei linfociti nei pazienti con SSc. Successivamente è stato indagato il meccanismo patogenetico della trombosi nell'APS attraverso lo studio della resistenza alla proteina C attivata. Sono stati poi valutati l'influenza clinica dei diversi valori di cut-off nella determinazione degli anticorpi anticardiolipina e il significato clinico di un particolare anticorpo antifosfolipide specifico per l'acido lisobisfosfatidico (LBPA).

I risultati ottenuti studiando i pazienti affetti da SSc indicano che, solo nei pazienti positivi per anticentromero (ACA) e anti-topoisomerasi I (ATA) è presente un significativa prevalenza di MN, indice di danno cromosomico. Inoltre solo in questi due gruppi di pazienti esiste una interferenza nel meccanismo di protezione normalmente utilizzato dalle cellule per stabilizzare le rotture a doppio filamento del DNA. I sieri di questi pazienti sono stati utilizzati anche per calcolare, tramite la tecnica TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling), la frequenza di linfociti apoptotici. I linfociti dei pazienti anti-RNA polimerasi III (ARA) positivi sono risultati più soggetti ad apoptosi rispetto a quelli dei pazienti ACA e ATA positivi; ciò può essere dovuto a un diverso danno cellulare o ad una diversa percezione dello stesso danno cellulare tra pazienti ARA, ACA e ATA positivi.

Quando abbiamo approfondito la resistenza della proteina C attivata nell'APS abbiamo dimostrato che non è necessario il legame diretto degli anticorpi con i fosfolipidi di membrana per determinare l'aumento della resistenza alla proteina C attivata.

Per quanto riguarda l'influenza dei differenti valori di cut-off degli anticorpi anticardiolipina abbiamo osservato che nella classificazione dell'APS il cut-off > 99° percentile è più sensibile di quello >40 GPL. Esso consente infatti di individuare un maggior numero di pazienti con singola positività per aCL e/o con impegno ostetrico esclusivo.

Infine, lo studio del significato clinico degli anticorpi anti-LBPA in pazienti con sindrome da antifosfolipidi primaria ha dimostrato che tali anticorpi al momento non possono essere considerati uno strumento utile alla diagnosi dell'APS e nella distinzione dei diversi sottogruppi clinici e di laboratorio della malattia.

INSTABILITA' CROMOSOMICA E APOPTOSI NEI LINFOCITI DI PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI SISTEMICA [1,2]

INTRODUZIONE

La sclerosi sistemica (SSc) è una malattia autoimmune caratterizzata da un ampio spettro di alterazioni cliniche e sierologiche sostenute da un lato dalla fibrosi, cioè il deposito di collagene a livello della cute e di altri organi e apparati, dall'altro da un disordine del microcircolo [3]. Il suo spettro di presentazione è molto ampio e va da forme con impegno cutaneo diffuso, lesioni viscerali plurime e rapida evolutività clinica a forme con alterazioni cutanee localizzate, prive di coinvolgimento viscerale e con decorso molto lento nel tempo.

Sulla base dell'estensione delle lesioni cutanee la SSc viene distinta in una forma diffusa e in una limitata. Nella forma diffusa il decorso è rapido e la sclerosi cutanea, preceduta di solito di pochi mesi dal fenomeno di Raynaud, si estende rapidamente a tutta la superficie corporea, interessando anche la parte prossimale degli arti e il tronco. Nella forma limitata, che segue anche di vari anni il fenomeno di Raynaud, la sclerosi cutanea rimane confinata alla parte distale degli arti e gli impegni viscerali sono più tardivi e meno frequenti. Questa forma è caratterizzata da impegno viscerale meno frequente e spesso tardivo, per cui la prognosi è assai meno sfavorevole della precedente.

La prevalenza di questa malattia è di circa 10-20 nuovi casi per anno per milione di abitanti, ma è probabilmente sottostimata per la presenza di forme oligosintomatiche che non vengono diagnosticate. E' nettamente prevalente nel sesso femminile con un rapporto variabile da 3/1 a 9/1 nelle principali casistiche. Si manifesta più frequentemente tra 30 e 50 anni anche se può insorgere a qualsiasi epoca della vita [4].

Autoanticorpi sierici

Il 90% dei pazienti affetti da SSc presentano nel loro siero anticorpi anti nucleo (ANA), ossia autoanticorpi diretti contro antigeni nucleari di varia natura. Gli ANA della SSc quando vengono determinati su cellule HEp-2 (linea cellulare dal carcinoma laringeo umano) sono caratterizzati da alti titoli e da due principali

quadri fluoroscopici: il centromerico e il granulia diffusa (figura 1 e 2). Il primo è caratterizzato da numerose, grossolane granulazioni rotonde od ovoidali, disperse nel nucleo delle cellule in interfase e raccolte nella piastra cromosomica nelle cellule in mitosi; il suo antigene è situato nel centromero dei cromosomi e il suo ANA specifico corrispondente è l'anticorpo anticentromero (ACA).

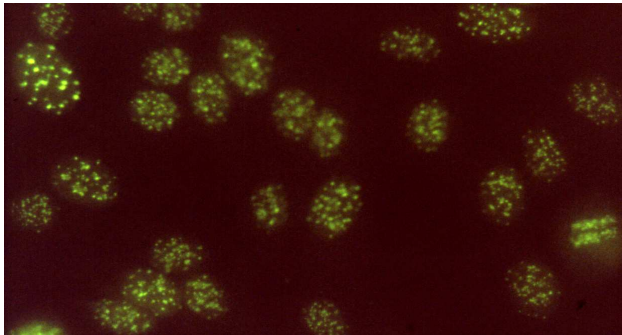


Figura 1. Pattern centromerico degli anticorpi antinucleo su cellule HEp-2. Sono visibili con la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta grossolane granulazioni rotonde od ovoidali sparse nei nuclei delle cellule in interfase e raccolte nei cromosomi della cellula in telofase (500X).

Il secondo pattern fluoroscopico è il granulia diffusa il quale è caratterizzato da numerosissimi fini granulazioni che colorano i nuclei in interfase in modo diffuso e più intensamente la piastra cromosomica delle cellule mitotiche; il suo antigene è la topoisomerasi I e l'ANA specifico corrispondente è l'anticorpo anti-topoisomerasi I (ATA).

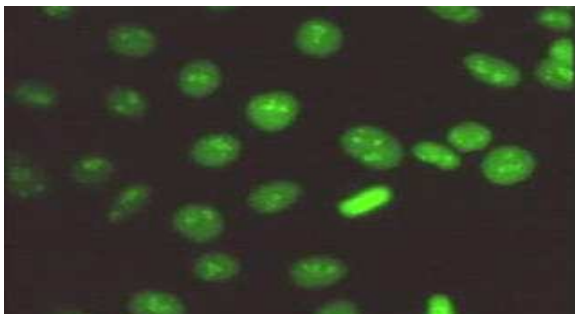


Figura 2. Pattern a granulia diffusa all'immunofluorescenza su cellule HEp-2. Il siero colora in maniera diffusa e un po' sfuocata il nucleo delle cellule in mitosi,

mentre colora più intensamente i cromosomi della cellula in metafase. Si osserva, associata, positività dei nucleoli (500X).

Nella SSc si possono ritrovare più raramente anche altri quadri fluoroscopici come il nucleolare, che colora i nucleoli delle cellule in interfase, il punteggiato a grossi grani, caratterizzato da grossolane granulazioni presenti solo nei nuclei in interfase, e il punteggiato a fini grani, costituito da fini granulazioni indistinguibili tra loro e localizzate solo nei nuclei in interfase [5].

I tre principali ANA specifici della SSc sono gli anticorpi ACA, gli ATA, e gli anti-RNA polimerasi III (ARA). Sono poi presenti con frequenza di gran lunga minore anche altri anticorpi, come gli anti-fibrillarina, gli anti U1-RNP e gli anti-PM/Scl, quest'ultimo però è considerato marker della sindrome overlap sclerodermia/polimiosite.

Anche se il ruolo patogenetico degli autoanticorpi nella SSc non è tuttora conosciuto [6], essi hanno un importante valore diagnostico e prognostico in quanto sono i marcatori dei diversi sottogruppi clinici della SSc. Gli ACA normalmente sono diretti contro alcune proteine chiamate CENP-A,B,C,D,E,F e G di peso molecolare variabile tra 19 e 140 kDa, le quali interagiscono con l'apparato mitotico e i microtubuli quando la cellula è in divisione. Gli ACA nella sclerodermia si legano principalmente agli antigeni CENP-A, CENP-B e CENP-C [7]. Questi anticorpi sono raramente ritrovati in altre connettiviti e hanno quindi un elevato valore diagnostico per la forma limitata della SSc, la loro sensibilità è del 44% e la specificità del 93% [6].

Gli ATA, invece, sono presenti nettamente nella forma diffusa della SSc e sono diretti contro una proteina associata alla matrice nucleare e nel nucleolo la quale solitamente svolge la funzione di rilassare e contrarre la cromatina, ruolo indispensabile per la duplicazione del DNA. La caratterizzazione di questi anticorpi necessita di una tecnica ELISA con antigene purificato o di una tecnica di immunoprecipitazione in agarosio (controimmuno-elettroforesi) che utilizza una miscela di antigeni e dei sieri di riferimento a positività nota. La sensibilità degli ATA è del 43% mentre la specificità è del 90% [6]. Il terzo gruppo di ANA specifici presenti nella SSc sono gli ARA I, II e III i quali sono diretti contro complessi enzimatici formati da numerose subunità caratterizzate dal fatto di

catalizzare la trascrizione dei geni dal DNA all'RNA. Mentre il quadro fluoroscopico per gli ARA I è il nucleolare di tipo punteggiato, gli ARA II e III non hanno un quadro fluoroscopico corrispondente. Gli ARA possono essere ricercati con tecniche di radioimmunoprecipitazione e più recentemente mediante tecnica ELISA. La loro sensibilità è del 38% dei casi con forma diffusa, mentre la loro specificità è del 94% [8]. Essi si associano prevalentemente all'impegno renale della SSc ed in particolare alla crisi renale sclerodermica [9,10,11].

Instabilità cromosomica nella SSc

Fin dal 1967 si parla di instabilità cromosomica in riferimento alla SSc. Per instabilità cromosomica si intende un danno cromosomico acquisito, variabile da una cellula all'altra, consistente di aberrazioni cromosomiche (frammenti acentrici, dicentrici, anelli), di anomalie cromatidiche (gaps e breaks di uno o entrambi i cromatidi) dovuti a delezioni, traslocazioni reciproche e riarrangiamenti tra i cromosomi [12-20].

E' stata osservata un'instabilità cromosomica in colture di linfociti, in colture di fibroblasti e nel midollo osseo di pazienti con SSc.

Già nel 1967 Khondkarian et al [12] e nel 1969 Housset et al. [13] avevano riscontrato un aumento della frequenza di rotture cromosomiche spontanee nei linfociti dei pazienti sclerodermici, più tardi nel corso degli anni '70 Emerit [14] riscontrò la presenza di aberrazioni nelle colture di linfociti e vide che queste alterazioni erano presenti anche nel midollo osseo, dimostrando così che non potevano essere dovute alle condizioni di coltura.

Nel 1975 Pan et al [15] riportano che pazienti con SSc, esposti a radiazioni, mostrano un significativo aumento delle rotture cromosomiche rispetto ai controlli esposti alle stesse radiazioni. Le radiazioni erano state utilizzate in quanto producono delle rotture non specifiche e riarrangiamenti cromosomici.

Powell et al, inoltre, nel 1986 [16] hanno voluto valutare la presenza di instabilità cromosomica nelle colture di linfociti da sangue periferico dei pazienti con SSc mediante il bendaggio GTG e osservare le anomalie sia strutturali che numeriche. In discordanza rispetto ai lavori precedenti non hanno trovato differenze significative rispetto ai controlli.

Più tardi negli anni 90 Wolff et al [17] eseguirono uno studio delle rotture cromosomiche indotte da più clastogeni per capire i meccanismi eziologici portanti a questa instabilità cromosomica e trovarono dei risultati in accordo con la letteratura. Il fatto di aver trovato una sensibilità a più clastogeni riflette probabilmente una generale suscettibilità del DNA a subire danni piuttosto che una ipersensibilità a particolari agenti.

Grazie al metodo del bendaggio G nel 1993 Jabs et al [18] hanno riscontrato che la forma limitata presenta un maggior numero di aneuploidie rispetto alla forma diffusa e ai controlli mentre nel 1996 Galeazzi et al [19] con la medesima tecnica non hanno riscontrato diversità nella tipologia delle aberrazioni cromosomiche strutturali e numeriche tra pazienti con SSc e soggetti affetti dal fenomeno di Raynaud.

La presenza di micronuclei spontanei nei linfociti di pazienti affetti da SSc è stata studiata da Porciello et al nel 2004 [20]. Essi hanno dimostrato mediante la tecnica FISH (Fluorescent in Situ Hybridation) che soltanto i linfociti dei soggetti con Raynaud presclerodermico mostravano un aumentato danno cromosomico, mentre per quanto riguarda l'analisi dello status dei micronuclei mediante FISH non hanno riscontrato una prevalenza di eventi aneuploidizzanti o clastogenici nella formazione dei micronuclei.

Apoptosi nella SSc

L'apoptosi o morte cellulare programmata è un importante meccanismo fisiologico finalizzato a regolare la risposta immunitaria e a mantenere una tolleranza immunologica. Questo meccanismo risulta alterato in molte malattie autoimmuni.

In letteratura il fenomeno dell'apoptosi nei linfociti dei pazienti affetti da SSc è stato analizzato in alcuni studi [21,22] che hanno esaminato i pazienti sclerodermici considerandoli senza distinzione di forma clinica o di tipo di pattern autoanticorpale.

Nello studio di Stummvoll et al [21], si riscontrava nei pazienti sclerodermici un aumento dell'apoptosi in alcune sottopopolazioni linfocitarie. Dopo 2 giorni di crescita in coltura, la percentuale di apoptosi era risultata aumentata, tuttavia scendeva a valori paragonabili a quelli dei controlli se si aggiungeva del plasma

autologo. Questo comportamento faceva ipotizzare che l'aumento dell'apoptosi fosse dovuto alla mancanza di citochine o fattori presenti invece nel plasma. Inoltre nei linfociti dei pazienti sclerodermici risultava aumentata l'espressione di CD95, una molecola deputata a trasdurre segnali per l'apoptosi. Si dimostrava anche un incremento nel siero di altre molecole implicate nell'apoptosi, come Fas e FasL solubili. Questi risultati non presentavano valori significativamente differenti nei pazienti con la forma limitata rispetto a quelli con la forma diffusa. Il successivo studio di Kessel et al [22] conferma quanto è stato evidenziato nel precedente lavoro ossia un aumento dell'apoptosi nei pazienti affetti da SSc.

Scopi dello studio

Lo scopo del lavoro è stato quello di dare un contributo alla comprensione dei meccanismi genetici presenti nella SSc. Nella prima parte ci siamo proposti di valutare se nei pazienti sclerodermici vi fosse un'interferenza a livello dei meccanismi cellulari di protezione, che normalmente stabilizzano le rotture del DNA. Di conseguenza sono stati esaminati gli effetti clastogenici sul DNA nei linfociti dei pazienti con SSc ed è stata valutata la presenza di terminazioni 3'-OH libere del DNA. Gli effetti clastogenici del DNA sono stati analizzati anche mediante il calcolo della frequenza di cellule micronucleate in colture di linfociti dei pazienti con SSc, che sono stati suddivisi sulla base del pattern autoanticorpale in tre gruppi, rispettivamente anti-centromero, anti-topoisomerasi I e anti-RNapolimerasi III positivi. Successivamente si è proceduto a caratterizzare i micronuclei per la presenza o assenza di frammenti di DNA mediante la metodica dell'incorporazione di Digossigenina-dUTP.

Nella seconda parte è stata valutata con la tecnica TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated deoxyuridine triphosphate [dUTP] nick-end-labeling) la frequenza di linfociti apoptotici nei pazienti con SSc e i risultati sono stati analizzati nei tre sottogruppi clinici di pazienti, che sono stati confrontati con il gruppo di controllo e tra di loro.

MATERIALI E METODI

Pazienti e Controlli

Abbiamo preso in considerazione 39 pazienti affetti da SSc , 38 donne e 1 uomo con età media di 50,9 anni $\pm$ 11,2DS , range 31-74 anni; 23 soggetti avevano la forma clinica diffusa e 16 la forma limitata, diagnosticate sulla base dei criteri dell'American Rheumatism Association [4]. Per ogni paziente è stato inoltre valutato l'impegno clinico sulla scorta dei dati della letteratura [4]. In particolare sono stati considerati: il fenomeno di Raynaud, l'interessamento esofageo, polmonare, cardiaco e renale. L'impegno renale è stato analizzato usando i seguenti parametri: ipertensione (trattamento con farmaci anti-ipertensione), danno renale (creatinina > 1.3 mg/dl), proteinuria (>0.5 g/24h) ed ematuria. Al fine di escludere interferenze farmacologiche sono stati esclusi dallo studio tutti i pazienti che erano in trattamento negli ultimi 6 mesi con farmaci o altri elementi induttori di instabilità cromosomica o apoptosi (ad esempio: ciclofosfamide, raggi X, raggi ultravioletti, ecc...).

Sono stati considerati popolazione di controllo 15 soggetti sani, omogenei per età e sesso con i pazienti.

Sulla base del profilo anticorpale sono stati distinti 3 gruppi. Il primo gruppo comprendeva 16 pazienti positivi per ACA, il secondo 15 positivi per ATA ed il terzo 8 positivi per ARA.

Sedi di esecuzione dei metodi di laboratorio

Tutte le tecniche di determinazione degli autoanticorpi sono state eseguite presso il Laboratorio di Immunopatologia della Cattedra di Reumatologia, mentre il test dei micronuclei, il metodo FISH e l'identificazione dei linfociti apoptotici sono stati effettuati presso il Laboratorio di Genetica dell'Istituto Vallisneri.

Determinazione degli autoanticorpi

1) Gli ANA sono stati determinati mediante immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule HEp-2 e gli ACA con lo stesso metodo sulla base del pattern di immunofluorescenza di tipo centromerico.

IFI

Questa è una tecnica particolarmente utile nello svelare anticorpi presenti nel siero e diretti contro antigeni cellulari. Il siero contenente il sospetto autoanticorpo viene fatto reagire con il substrato antigenico; dopo lavaggi viene aggiunto un siero di antimmunoglobuline coniugato con fluoresceina che si lega all'eventuale anticorpo. Per evidenziare gli ANA come substrato vengono utilizzate le cellule Hep-2, una linea cellulare continua di adenocarcinoma laringeo umano, che presentano un tempo di raddoppiamento intorno alle 24-36 ore. Vengono usati vetrini commerciali con cellule Hep-2 adese forniti dalla ditta Immuno Concept (Sacramento, California, USA), ciascuno costituiti da 12 pozzetti.

I vetrini vengono prima di tutto lasciati asciugare a temperatura ambiente per circa 5 minuti. Nel frattempo i sieri, ottenuti da sangue intero venoso centrifugato a 3000 rpm per 10 minuti, vengono diluiti 1:40 con una soluzione di tampone fosfato (PBS) a pH 7,4. Evitando di toccare la superficie del vetrino (ciò potrebbe danneggiare il substrato) si ricopre l'antigene di siero diluito (20 µl). La reazione antigene anticorpo richiede 30 minuti a temperatura ambiente, in una camera umida chiusa da coperchio per evitare l'evaporazione. Il siero viene allontanato tramite 2 lavaggi di 10 minuti ciascuno utilizzando la soluzione tampone. Una volta effettuati i lavaggi, ogni vetrino viene asciugato con cura evitando la zona di semina, e dopo averlo riposto nella camera umida si ricopre il substrato antigenico con immunosiero fluorosceinato. A tale scopo viene utilizzato il preparato commerciale "FITC antibody reagent" fornitosi dalla ditta Immuno Concept (Sacramento, California, USA).

Si lasciano incubare i vetrini a temperatura ambiente per 30 minuti, nella camera umida e si effettuano successivamente tre lavaggi in tampone PBS a pH 7,4 per allontanare l'immunosiero che non ha reagito. Ogni vetrino viene asciugato accuratamente e, sempre nella camera umida, viene aggiunta una goccia di tampone a base di glicerolo a pH 9,1 ad ogni pozzetto. Infine, i vetrini vengono conservati in frigorifero ad una temperatura tra +4°C e +8°C fino al momento della lettura. Questa viene effettuata entro 7 giorni per evitare un notevole decadimento della fluorescenza ed il conseguente rischio di risposte falsamente negative.

Per le lettura viene usato un microscopio a fluorescenza Leitz Ortoplan ad illuminazione incidente ultravioletta.

Qualora un siero risulti positivo può essere richiesta la sua titolazione. Si preparano, quindi delle diluizioni scalari.

Il titolo di un siero è la minima concentrazione (o massima diluizione) dello stesso che risulta ancora positiva alla lettura.

Per la corretta esecuzione di questo protocollo è necessario che l'ultima diluizione risulti negativa alla lettura. Se così non fosse bisogna allestire ulteriori diluizioni. E' stato considerato basso titolo un valore ≤ 320 ed alto titolo un valore ≥ 640 . Il tampone a base di glicerolo o mounting medium è costituito da glicerolo e PBS nella proporzione 1:1.

L'esito dell'indagine va riportato non solo in termini di positività o negatività ma anche in termini di pattern di reattività secondo la terminologia al momento standardizzata: omogeneo, periferico, nucleolare, punteggiato a fini grani, punteggiato a grossi grani e centromerico. Va tuttavia sottolineato al riguardo che non vi è un'associazione stretta tra tipologia del pattern e specificità anticorpale, l'unica eccezione al riguardo è rappresentata dall' ACA che corrisponde al quadro centromerico.

2) Gli ATA sono stati evidenziati mediante il quadro fluoroscopio a granulia diffusa caratterizzato da una immagine granulare sfuocata associata a positività dei nucleoli (figura 2). Tuttavia questo pattern è di difficile definizione, pertanto è necessario confermare la presenza degli ATA con un altro metodo di laboratorio più specifico come la controimmunolettroforesi (CIE), il metodo immunoenzimatico (ELISA, enzyme linked immunosorbent assay) o l'immunoblotting. Nel nostro laboratorio gli ATA vengono di norma ricercati con una tecnica di CIE "in-house".

CIE

È una metodica di immunoprecipitazione in agarosio, in cui l'antigene dotato di carica elettrica negativa, viene spinto dalla corrente a diffondere in maniera unidirezionale dal polo negativo al polo positivo, verso l'autoanticorpo che, meno sensibile agli impulsi della corrente, diffonde per lo più in modo circolare.

Al momento dell'incontro tra l'antigene e l'anticorpo, se vi è specificità, si forma un legame stabile, e nel punto di equivalenza tra antigene ed anticorpo si forma una linea di precipitazione visibile.

La tecnica utilizzata è la controimmunolettroforesi, la quale, oltre ad essere molto sensibile, possiede la caratteristica di identificare i singoli autoanticorpi specifici per diversi antigeni nucleari estraibili, i quali sono contenuti nell'estratto di timo di coniglio, e che possono essere evidenziati attraverso l'uso di diversi sieri di riferimento positivi per i singoli autoanticorpi ed il successivo confronto delle linee di precipitazione date dai sieri (figura 3). Sono stati usati i tamponi e le soluzioni di seguito indicate.

Tampone PBS a pH=7,4 (soluzione salina tamponata); tampone Barbitol a pH=8,6; barbitol sodico 89,7 g; HCl 1N 645,0 g; H₂O distillata quanto basta a 5000 ml; agarosio B (Pharmacia AB, Svezia) 1% e 0,6% (peso/volume) in tampone Barbitol e H₂O distillata (50/50 vol/vol).

I sieri ottenuti da sangue venoso centrifugato, 3000 rotazioni per minuto (rpm) x 10 min, vengono conservati in provette di plastica Kartell a -20°C fino al momento dell'uso; quindi vengono scongelati lentamente a temperatura ambiente e usati.

A 510 mg di polvere acetanata di timo di coniglio, usata come sorgente di materiale nucleare, vengono aggiunti 5 ml di tampone PBS a pH 7,4 in una provetta di vetro a fondo piatto. Tale provetta viene inserita in un agitatore circolare e sottoposta a blanda agitazione per 4 ore a temperatura ambiente. Successivamente la provetta viene posta in centrifuga a 2680 rpm per 10 minuti. Infine, il supernatante viene aspirato, aliquotato in provette di plastica in volumi di 1400 µl, ed immediatamente posto in congelatore a -20°C dove viene conservato fino al momento dell'uso, per un periodo comunque non superiore ai tre mesi. Oltre questo limite, infatti, gli antigeni nucleari estraibili si deteriorano.

Per la corsa elettroforetica vengono utilizzati vetrini delle dimensioni di 7,1 x 7,1 cm, coperti con due strati di soluzione di agarosio. Un primo strato viene effettuato con 4 ml di soluzione al 1%, mentre, il secondo, posto sopra il primo gelificato, con 8 ml di soluzione allo 0.6%. Sugli strati gelificati vengono quindi eseguite, con l'aiuto di un punzone aspiratore, due file di 13 pozzetti ciascuna (diametro pozzetti: 4 mm; distanza tra pozzetti contigui: 2 mm) lungo i due lati

opposti del vetrino. A distanza di 1 cm da ognuno di questi pozzetti, seguendo la stessa direzione, viene segnata una traccia per una scanalatura della lunghezza di 6.8 cm e della larghezza di 0.5 cm. Nei pozzetti di numero dispari vengono posti 20 μ l del siero di controllo immunologicamente identico al siero di riferimento fornito dal Centro per il controllo delle malattie (CDC, Atlanta, USA), mentre nei pozzetti di numero pari vengono posti 20 μ l del siero in esame. I vetrini vengono sistemati, con i pozzetti dei sieri più vicini al polo di corrente positivo e la scanalatura al polo di corrente negativo, in una cella per elettroforesi, nelle cui camere si versa un congruo volume di tampone Barbitol. Si avvia quindi la prima parte della corsa della durata di 30 minuti, ad una corrente di 10 mA per ogni vetrino utilizzato, allo scopo di stimolare la diffusione nell'agarosio dell'eventuale anticorpo presente nel siero. Trascorso questo tempo viene tolto l'agarosio dalla scanalatura precedentemente segnata e quindi posti 300 μ l di estratto di timo di coniglio per la ricerca di tutti gli anti ENA tranne l'SSA, per il quale vengono utilizzati 250 μ l di milza porcina. Veniva quindi effettuata una seconda corsa elettroforetica della durata di 40 minuti alla stessa intensità di corrente, al fine di spingere l'antigene verso l'eventuale anticorpo precedentemente diffuso. Al termine di questa corsa, i vetrini vengono allontanati dalla cella per elettroforesi e posti per l'incubazione in una camera umida a temperatura ambiente per 12 ore. Tale intervallo di tempo consente una ulteriore diffusione sia dell'antigene che dell'eventuale autoanticorpo e la formazione del loro legame nel punto di equivalenza con conseguente comparsa della linea di precipitazione.

I risultati vengono interpretati come positivi o negativi in base alla presenza o meno della linea di precipitazione davanti al pozzetto del siero in esame. Successivamente, in caso di positività, la linea di precipitazione viene confrontata con quella prodotta dal siero di riferimento positivo per l'autoanticorpo in esame e nel nostro lavoro per l'ATA.

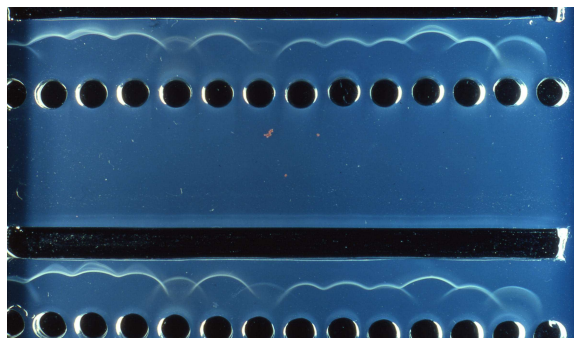


Figura 3. Controimmunolettroforesi. Nella scanalatura centrale viene seminato l'antigene, nei pozzetti di fronte vengono seminati i sieri (nei pari i sieri in esame, nei dispari i sieri di controllo). In presenza di positività per anticorpi anti-ENA (antigeni nucleari estraibili) si avrà una linea di precipitazione. I sieri che danno una linea di precipitazione che si identifica perfettamente con quella dei sieri di controllo vengono considerati identici a quelli di controllo (2-3, 8-9, 4-3, 10-9). I sieri che danno una linea di precipitazione che incrocia parzialmente saranno considerati parzialmente identici ai sieri di controllo (2-1, 10-11, 12-11), mentre i sieri che incrociano le linee prodotte dai sieri di controllo saranno considerati diversi rispetto ai controlli (4-5, 6-5, 6-7, 8-7, 12-13)

Gli ARA sono stati determinati con il metodo ELISA utilizzando un kit commerciale (MBL, Tokyo, Japan) contenente l'RNA polimerasi III ricombinante [23]. Per l'esecuzione del test sono state seguite le raccomandazioni della Ditta fornitrice del kit.

Culture di linfociti periferici

Sono stati raccolti campioni di sangue in provette contenenti eparina sodica come anticoagulante. Il sangue era diluito 1:1 con un tampone fosfato-salino (PBS) e messo a contatto con un gel (histopaque) alla diluizione di 2 parti di sangue e una di gel. Dopo la centrifugazione a $500 \times g$ per 45 minuti il plasma veniva rimosso e gettato. Lo strato di cellule mononucleari era recuperato e aggiunto a 20 ml di RPMI (Sigma, St. Louis, MO, USA). L'analisi al citofluorimetro mostra la presenza di 80% di linfociti e di un 20% di altre cellule mononucleate. Dopo una seconda centrifugazione a $400 \times g$ per 15 minuti le cellule venivano risospese in 20 ml di RPMI e dopo un'altra centrifugazione vengono risospese in 5 ml di

RPMI. Le cellule vengono quindi contaminate, centrifugate e risospese in un volume appropriato di RPMI. Le colture di linfociti erano messe in un mezzo contenente fitoemoagglutinina (PHA, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) a una concentrazione di 20 µg/ml e incubate in atmosfera al 5% di CO₂ per 72 ore a 37° C. E' già stato dimostrato che PHA dopo un periodo di 72 ore attiva i linfociti, i quali, crescono e si riproducono di almeno 3 volte. Per poter effettuare il test dei micronuclei alla quarantaquattresima ora si aggiungeva citocalasina B (3µg/ml). Questo trattamento serve a bloccare la citodieresi delle cellule, in modo tale che si formino cellule binucleate in cui sia possibile osservare i micronuclei. I linfociti erano infine raccolti e fissati per quindici minuti in paraformaldeide (1% in PBS) pronti per il test dei micronuclei e l'analisi dell'incorporazione *in situ*.

Test dei micronuclei

La frequenza dei micronuclei viene calcolata come il numero delle cellule contenenti uno o più micronuclei per 100 linfociti binucleati. Sono state contaminate circa 3000 cellule per ogni campione, usando almeno due vetrini per campione. I micronuclei sono visibili come piccoli nuclei vicino al nucleo principale nel citoplasma delle cellule interfasiche che hanno completato almeno un ciclo cellulare.

FISHI (fluorescence in situ hybridization and incorporation)

Questa tecnica permette di localizzare e segnalare la presenza di estremità 3'-OH libere all'interno del filamento di DNA mediante l'azione di enzimi che aggiungono a queste estremità nucleotidi modificati e coniugati ad un fluorocromo. Il protocollo sperimentale che è stato utilizzato prevede inizialmente due lavaggi con HBS (NaCl 280 mM, Na₂ HPO₄ x 7H₂O 1,5 mM). Si procede poi con l'incorporazione in situ di DIG-11-dUTP mediante l'enzima TdT. Questa reazione richiede: 10 µl di una soluzione contenente cacodilato di potassio 1 M, Tris-HCl 125 M (pH 6,6, 4°C), Bovine serum albumine (BSA) 1,25 mg/ml, CaCl₂ 10 mM; 0,2 µl di una soluzione contenente TdT (25 unità/µl), EDTA 1mM, 2-mercaptoetanol 4 mM, glicerolo 50% (v/v) (pH 6,6, 4°C); 1 µl di miscela di DIG-11-dUTP (1mM). Si aggiunge acqua distillata fino ad ottenere un volume di 50 µl. Il vetrino con le cellule viene incubato con questa soluzione a 37°C per 1

ora in un'atmosfera umidificata con HBS successivamente viene immerso in una vaschetta contenente 0,1% Triton X-100 e 0,5% BSA in HBS ed infine posto a contatto con l'anticorpo antiDIG-11-dUTP (diluizione 1:50) marcato con FITC (fluoresceina isotiocianato). La reazione viene condotta a temperatura ambiente per 30 minuti in un'atmosfera umidificata con HBS; il vetrino viene poi lavato 3 volte per 5 minuti con la stessa soluzione di HBS. Infine si pone sui vetrini una miscela di ioduro di propidio e antifade DABCO (1,4-diaza-bicyclo 2,2,2 octano) (Sigma,USA) e poi un coprioggetti di vetro. Lo ioduro di propidio reagisce esclusivamente con il DNA colorandolo di rosso, mentre l'antifade DABCO è un efficace agente di quenching in grado di limitare la perdita di fluorescenza nel tempo.

Sono state valutate per la presenza dell'incorporazione più di 3000 cellule per ogni vetrino.

Identificazione dei linfociti apoptotici

I linfociti apoptotici sono stati identificati nel corso della metodica TUNEL direttamente coniugate con fluoresceina isotiocianato (FITC, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

Analisi statistica

Il confronto statistico delle frequenze degli effetti citogenetici nei tre gruppi di pazienti è stato eseguito con il G-test [24]. Il Fisher's exact test è stato usato per studiare le associazioni tra le caratteristiche cliniche e i profili anticorpali mentre l'U test di Mann-Whitney per il confronto tra l'età media e la durata media della malattia nei 3 gruppi di pazienti. Il valore $p < 0,05$ è considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Gli autoanticorpi

Gli ANA erano presenti in 38 sieri (97,4%) ed erano caratterizzati dai seguenti patterns: centromerico in 16 casi (42,1%), granulia diffusa in 15 (39,4%), nucleolare in 3 (7,8%), punteggiato a fini granuli in 2 (5,2%), punteggiato a grossi granuli in 1 (2,6%) e omogeneo in 1 (2,6%). Gli ACA (figura 1) sono stati quindi trovati in 16 pazienti, 14 affetti dalla forma limitata e 2 con la variante diffusa. Gli ATA sono stati rilevati, tramite la CIE (figura 2) in 15 sieri, tutti presentanti il pattern a granulia diffusa (figura 3). Di questi 15 pazienti, 14 erano affetti dalla forma diffusa ed 1 dalla forma limitata. Gli ARA, rilevati tramite la tecnica ELISA erano presenti in 8 pazienti, di cui 7 affetti dalla forma diffusa e 1 dalla variante limitata.

Analisi dell'instabilità cromosomica

La frequenza media di cellule contenenti micronuclei (figura 4) nei pazienti con ACA e ATA è risultata essere statisticamente più alta rispetto ai controlli (rispettivamente 4,32% e 2,34% versus 0,82%, $P < 0,001$). Inoltre nei pazienti ACA positivi si rilevava una frequenza di cellule micronucleate significativamente maggiore rispetto ai pazienti ATA positivi (4,22% versus 2,34%, $P < 0,001$). Al contrario i soggetti ARA positivi avevano una prevalenza più bassa di cellule micronucleate (0,98%), che non era significativamente differente da quella dei controlli sani (0,82%). La natura del danno cromosomico all'interno dei micronuclei è stata esaminata nei linfociti dei pazienti e dei controlli tramite la metodica dell'incorporazione *in situ* di DIG-dUTP usando l'enzima TdT (figura 4). Come si può osservare nella figura 4 la frequenza di frammenti instabili che avevano incorporato la DIG-dUTP era significativamente più alta nei pazienti ACA e ATA positivi rispetto ai controlli (rispettivamente 36% e 20,08% versus 1,18%, $P < 0,001$). Tuttavia l'aumento era risultatato significativamente maggiore nei linfociti dei pazienti con ACA rispetto a quelli con ATA (36% versus 20,08%, $P < 0,001$). Al contrario la prevalenza di frammenti instabili di DNA nei pazienti ARA positivi era più bassa (2,05%), e non statisticamente differente rispetto ai

controlli (1,18%). Le immagini relative all'incorporazione di Dig-dUTP nei micronuclei di linfociti di pazienti sclerodermici sono mostrate nella figura 5.

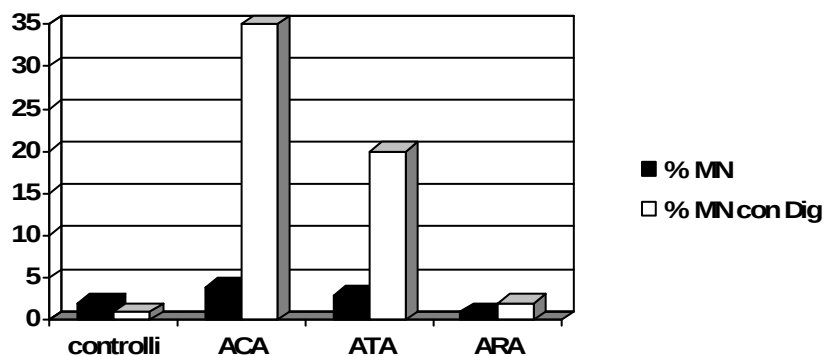


Figura 4. La colonna nera mostra la % di micronuclei, la colonna bianca la % di micronuclei che hanno incorporato la DIG-dUTP, rispettivamente nei controlli sani, nei pazienti ACA positivi, nei pazienti ATA positivi e negli ARA positivi .

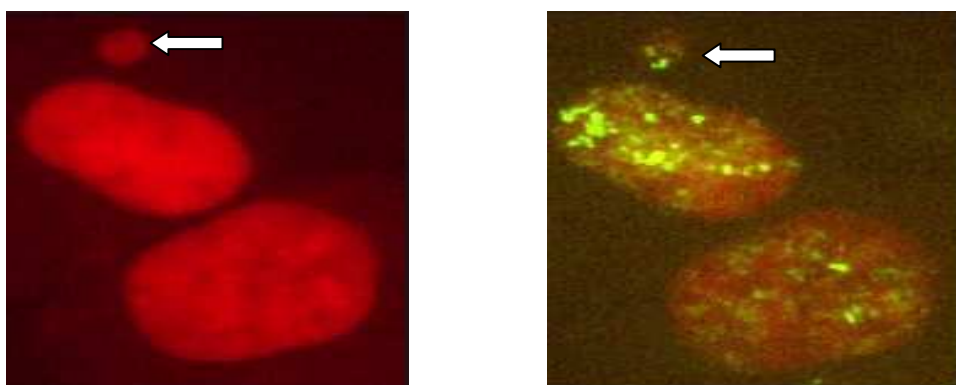


Figura 5. E' indicato dalla freccia un micronucleo e l'incorporazione di Dig-dUTP all'interno di un linfocita binucleato in coltura (100X).

Le caratteristiche cliniche dei tre gruppi di pazienti SSc sono riportate nelle tabelle I,II e III. E' stata studiata l'associazione tra le forme cliniche di SSc, fenomeno di raynaud's, impegno esofageo, polmonare, cardiaco e renale e i profili anticorpali.

Di 4 pazienti ACA positivi non è stato possibile conoscere le caratteristiche cliniche.

Tabella I. Caratteristiche cliniche dei pazienti ACA positivi

Sesso	Età	Forma clinica	Raynaud	Impegno Esofageo	Impegno Polmonare	Impegno Cardiaco	Impegno Renale
F	65	Limitata	+	+	-	-	-
F	59	Limitata	+	+	+	-	-
F	33	Limitata	+	-	-	-	-
F	45	Limitata	+	-	+	-	-
F	57	Diffusa	+	+	+	-	-
F	70	Limitata	+	+	+	+	-
F	45	Limitata	+	-	+	-	-
F	62	Limitata	+	-	+	-	-
F	59	Limitata	+	+	+	-	+
F	74	Limitata	+	+	+	-	-
F	58	Limitata	+	+	-	+	-
F	36	Limitata	+	+	+	-	-

+ =presenza, - = assenza, F= femmina, M= maschio

Tabella II. Caratteristiche cliniche dei pazienti ATA positivi

Sesso	Età	Forma clinica	Raynaud	Impegno Esofageo	Impegno Polmonare	Impegno Cardiaco	Impegno Renale
F	58	Diffusa	+	+	+	-	-
F	41	Diffusa	+	-	-	-	-
F	52	Diffusa	+	+	+	-	-
F	59	Diffusa	+	+	+	-	-
F	37	Diffusa	+	-	+	-	-
F	43	Diffusa	+	-	-	-	-
F	37	Diffusa	+	-	+	-	-
M	43	Limitata	+	-	+	+	-
F	59	Diffusa	+	+	+	-	-
F	31	Diffusa	+	+	-	-	-
F	51	Diffusa	+	+	+	-	-
F	59	Diffusa	+	+	+	-	-
F	51	Diffusa	+	+	-	-	-
F	34	Diffusa	+	+	+	-	-
F	56	Diffusa	+	-	+	-	-

+ =presenza, - = assenza, F= femmina, M= maschio

Tabella III. Caratteristiche cliniche dei pazienti ARA positivi

Sesso	Età	Forma clinica	Raynaud	Impegno Esofageo	Impegno Polmonare	Impegno Cardiaco	Impegno Renale
F	58	Diffusa	+	+	-	+	+
F	58	Limitata	+	+	-	+	+
F	48	Diffusa	+	-	-	-	-
F	46	Diffusa	+	-	+	-	+
F	59	Diffusa	+	-	-	+	-
F	55	Diffusa	+	-	+	-	-
F	33	Diffusa	+	+	+	-	+
F	34	Diffusa	+	-	+	-	+

+ =presenza, - = assenza, F= femmina, M= maschio

Una significativa prevalenza dell'impegno renale è stata riscontrata nei pazienti positivi per ARA se confrontati con i gruppi ACA ($p<0,01$) e ATA ($p<0,002$). Il test U di Mann-Whitney rivela una non significativa differenza tra il valore dell'età media nei tre gruppi di pazienti ma mostra che la durata media della malattia è più corta ($p<0,05$) nei pazienti ARA (117 mesi $\pm$ 105,3 DS) rispetto al gruppo ATA (161 mesi $\pm$ 49,8 DS). I pazienti ARA con un valore di apoptosi sopra il valore medio mostrano una più bassa età media (43 anni $\pm$ 12,2 DS) e una minor durata media della malattia (57 mesi $\pm$ 45 DS) rispetto a quelli con un valore di apoptosi sotto il valore medio (54,7 $\pm$ 4,72 DS e 177 $\pm$ 119,3 DS, rispettivamente). Il numero limitato di campioni non ci permettono di confrontare la prevalenza di apoptosi negli impegni polmonari, cardiaco, renale dei pazienti ARA positivi.

Analisi dell'apoptosi

I risultati della percentuale di apoptosi rilevata nei linfociti periferici dei tre sottogruppi di pazienti con SSc e dei controlli sono visibili nella figura IV.

Tabella IV. Prevalenza di cellule apoptotiche (valore medio $\pm$ deviazione standard) nei pazienti SSc e nei controlli sani.

Controlli sani (range)	Pazienti con anticorpi anti- centromero (range)	Pazienti con anticorpi anti- topoisomerase I (range)	Pazienti con anticorpi anti- RNA polimerasi III (range)
4,50 $\pm$ 0,44 % (4,00-5,00)	5,00 $\pm$ 0,42% (4,50-5,50)	5,25 $\pm$ 0,44% (4,75-5,75)	14,29 $\pm$ 7,82% ^a (5,88-26,77)

^aIndividual data: 5,88, 11,11, 7,21, 19,35, 11,76, 9,00, 23,30, 26,77%.

La frequenza media di linfociti apoptotici nel gruppo di pazienti ARA è statisticamente più alta rispetto al gruppo di controllo ($p < 0,001$). La frequenza di linfociti apoptotici nei pazienti ACA e ATA non è statisticamente significativa rispetto al gruppo di controllo. Inoltre, la presenza di apoptosi nel gruppo di pazienti ARA è significativamente più alta rispetto al gruppo ACA ($p < 0,001$) e ATA ($p < 0,001$). La presenza di linfociti apoptotici è omogeneamente distribuita nei soggetti ACA e ATA ma non nei pazienti ARA. Grazie al G test abbiamo inoltre trovato che la percentuale di apoptosi è significativamente differente nel gruppo di pazienti ARA ($p < 0,001$), mentre non ci sono differenze nei gruppi ACA e ATA.

Al microscopio a fluorescenza i linfociti in apoptosi appaiono come corpuscoli di diversa grandezza, intensamente fluorescenti per la condensazione della cromatina (figura 6).

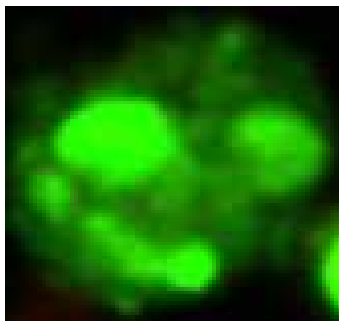


Figura 6. Linfocita in apoptosi. Esso è composto da corpuscoli di diversa grandezza, intensamente fluorescenti per la condensazione della cromatina.

DISCUSSIONE

La nostra casistica comprendeva un congruo numero di pazienti dove le due forme cliniche di SSc erano entrambe ben rappresentate. Gli impegni clinici della malattia sclerodermica erano equamente distribuiti nei tre gruppi di pazienti positivi rispettivamente per ACA, ATA e ARA; ad eccezione del coinvolgimento renale che era nettamente prevalente nei soggetti ARA positivi. Tale dato risulta in sintonia con la letteratura [5,6] che descrive nei soggetti ARA positivi una forma di malattia severa, spesso associata alla crisi renale sclerodermica.

Gli ANA erano presenti nella quasi totalità dei pazienti (97,4%), dove erano caratterizzati dai quadri fluoroscopici centromerico e granulia diffusa, quest'ultimo è risultato nettamente associato all'ATA. I sieri positivi per ARA non erano correlati ad alcun pattern fluoroscopico caratteristico, bensì ad una serie di pattern come il nucleolare, il punteggiato a fini grani, il punteggiato a grossi grani, l'omogeneo e in un caso alla negatività per ANA.

Nella prima parte del nostro studio è stata eseguita un'analisi citogenetica sui linfociti periferici di 39 pazienti affetti da SSc e su di una popolazione di controllo composta da 15 soggetti sani al fine di valutare la prevalenza di effetti clastogenici nella SSc. I risultati ottenuti hanno confermato i precedenti dati di letteratura [20,25] che sostenevano un'aumentata frequenza di micronuclei nei pazienti sclerodermici rispetto ai controlli. Pertanto viene enfatizzata la presenza di una forte instabilità genetica nei pazienti affetti da SSc. Ancora in accordo con altri autori abbiamo osservato che i pazienti positivi per ACA presentavano una significativamente più alta prevalenza di linfociti micronucleati rispetto ai pazienti con ATA. Inoltre per la prima volta abbiamo studiato la frequenza dei micronuclei nei linfociti di pazienti positivi per ARA e sorprendentemente è stata ritrovata in questi soggetti una bassa prevalenza di micronuclei del tutto simile a quella della popolazione di controllo.

I risultati ottenuti con la tecnica FISHI, finalizzata ad evidenziare le rotture di DNA instabili, sono del tutto simili ai precedenti. Infatti è stata ritrovata una prevalenza significativa di incorporazione nei pazienti ACA e ATA positivi rispetto ai controlli, mentre i soggetti ARA positivi presentavano una frequenza di frammenti instabili simile a quella della popolazione di controllo. Anche

quando sono stati confrontati tra loro i tre gruppi di pazienti sclerodermici è stata ritrovata una prevalenza significativa di incorporazioni dalla DIG-dUTP nei soggetti positivi per ACA.

Questi risultati appaiono, al momento, di difficile spiegazione, poiché paradossalmente i segni di instabilità cromosomica, vale a dire la presenza dei micronuclei e l'incorporazione di DIG-dUTP risultano significativamente prevalenti nel gruppo di pazienti ACA positivi, che generalmente sono affetti dalla forma clinica più benigna di SSc. Invece i pazienti clinicamente più impegnati, come sono quelli positivi per ARA, hanno mostrato una minore instabilità cromosomica, tra l'altro simile a quella della popolazione di controllo, come se il danno cromosomico pur essendo associato alla SSc non sia correlato alla gravità clinica della malattia sclerodermica.

L'originalità di questa prima parte del lavoro è consistita nell'evidenziare questo comportamento dei tests di instabilità cromosomica e di eseguire per la prima volta in letteratura la ricerca dei micronuclei e la ricerca con FISH di frammenti liberi di DNA nei pazienti sclerodermici positivi per ARA.

E' interessante notare che la ricerca sulle cellule di mammifero in coltura e *knocked out* per i geni coinvolti nella produzione delle proteine Ku80 o DNA PKcs, che sono importanti nel sistema di riparazione per gli eucarioti rivela un'aumento delle rotture instabili del DNA [26, 27], indicando così l'importanza di queste proteine nella protezione delle rotture del DNA [28, 29]. Anticorpi anti Ku sono stati osservati nei pazienti con SSc [30], indicando che in questa malattia potrebbe esserci una interferenza nel sistema di riparazione del DNA, mediante il blocco della proteina Ku che protegge le rotture del DNA. A tal proposito ricordiamo che nella SSc è stata anche osservata la riduzione di un telomero che può causare instabilità cromosomica [31]. Inoltre le ripetizioni telomeriche possono essere aggiunte alle estremità rotte del DNA, portando alla loro stabilizzazione e bloccando l'evoluzione verso inappropriate fusioni [32]. Fino ad ora il danno cromosomico osservato nei pazienti con SSc è stato messo in relazione con la presenza di un fattore clastogenico nel plasma di questi pazienti e sono state identificate diverse classi di sostanze con attività clastogenica [33-35]. E' stata anche suggerita una possibile interferenza di differenti tipi di anticorpi con il fattore clastogenico [33]. Questo lavoro conferma la presenza di eventi

clastogenici rilevati dalla presenza di micronuclei nei linfociti dei pazienti sclerodermici. Inoltre è stato visto che se una rottura del DNA avviene nella SSc essa rimane instabile, senza protezioni, portando alla formazione di nuove aberrazioni cromosomiche. Prima di questo lavoro era ritenuto che le rotture instabili nei pazienti sclerodermici fossero dovute alla riduzione telomerica. Dovrebbe essere ricordato che le rotture instabili del DNA sono presenti nelle cellule neoplastiche esprimenti la proteina TaxDHTLV-1 e in differenti tipi di tumori surrenalici. Questi risultati forniscono interessanti prospettive per la comprensione delle relazioni tra i meccanismi di controllo della stabilità genomica, la trasformazione tumorale e l'oncogenesi retrovirus mediata. Rimane comunque ancora da comprendere il significato della presenza nella SSc di questo particolare tipo di instabilità genetica ritrovato nelle neoplasie.

Nella seconda parte dello studio ci siamo occupati dell'apoptosi nei linfociti dei pazienti con SSc. Abbiamo osservato che essa risulta simile a quella dei controlli nei pazienti positivi per ACA, mentre è più elevata e raggiunge la significatività nei pazienti con ATA. Sorprendentemente è risultata significativamente molto elevata la prevalenza di apoptosi nei linfociti dei pazienti con ARA. Quando sono stati confrontati fra di loro i tre gruppi di pazienti sclerodermici quelli positivi per ARA hanno mostrato una significativa prevalenza di cellule apoptotiche. Gli studi della letteratura riguardanti l'apoptosi dei linfociti nei pazienti con SSc sono solo tre e tra l'altro discordanti tra loro. Infatti il lavoro di Stummvoll et al. [21] e quello di Kessel et al [22] hanno dimostrato un aumento dell'apoptosi in alcune sottopopolazioni di linfociti di pazienti sclerodermici, principalmente appartenenti alla popolazione CD8. Invece i CD4 risultavano in entrambi gli studi maggiormente protetti dall'apoptosi. Di conseguenza Kessel et al [22] ipotizzavano che la riduzione dei linfociti CD8 potesse determinare una riduzione della tolleranza e indurre così fenomeni autoimmuni nella SSc. Il nostro studio deve essere considerato da un'ottica diversa rispetto agli altri perché non ha studiato i pazienti affetti da SSc nella loro globalità, ma li ha distinti sulla base del pattern anticorpale. In questo modo è risultato che la prevalenza dell'apoptosi era sostanzialmente diversa nei tre gruppi di pazienti. In particolare quelli positivi per ARA, in accordo con gli studi di Stummvol et al [21] e Kessel et al [22] presentavano una frequenza di apoptosi nei linfociti

significativamente elevata rispetto ai controlli e rispetto agli altri due gruppi di pazienti sclerodermici.

A sostegno dei nostri risultati possiamo sottolineare che tutti i sottogruppi di pazienti sclerodermici erano ben rappresentati e ben distribuiti nella casistica e che erano pure presenti nei nostri pazienti tutti gli impegni clinici più caratteristici della SSc. Inoltre nessuno dei soggetti sclerodermici considerati era negli ultimi sei mesi in trattamento con farmaci induttori di apoptosi o era stato esposto ad accertamenti strumentali favorenti l'apoptosi. I nostri risultati appaiono difficilmente interpretabili e l'unica considerazione che ci sentiamo di fare è quella di sottolineare che l'apoptosi linfocitaria ha mostrato un incremento della prevalenza direttamente proporzionale alla gravità clinica dei pazienti, al contrario di quanto è stato osservato negli studi dell'instabilità cromosomica. Ulteriori studi sono necessari per verificare i nostri risultati e per approfondire ulteriormente le conoscenze sulla prevalenza e sul significato dell'instabilità cromosomica e dell'apoptosi linfocitaria nella SSc.

CONCLUSIONI

Gli autoanticorpi nella SSc hanno molto probabilmente un ruolo nella patogenesi, in considerazione della loro alta sensibilità e specificità e della loro associazione a quadri clinici diversi di SSc, anche se attualmente non è noto il motivo della loro presenza ed il loro meccanismo di azione.

In questo lavoro abbiamo suddiviso i pazienti affetti da SSc in tre gruppi sulla base dei tre principali autoanticorpi presenti in questa malattia: ACA, ATA e ARA. Nella prima parte dello studio abbiamo osservato che sono presenti effetti clastogenici nel DNA dei linfociti, evidenziati dal rilievo dei micronuclei, soprattutto nei pazienti positivi per ACA. Inoltre abbiamo dimostrato che il meccanismo protettivo cellulare normalmente usato per stabilizzare le rotture del DNA è deficitario nei linfociti dei pazienti sclerodermici e soprattutto in quelli positivi per ACA. Nella seconda parte del lavoro è stata valutata la prevalenza di linfociti apoptotici negli stessi tre gruppi di pazienti ed è stato osservato che l'apoptosi risulta aumentata principalmente nei linfociti dei pazienti positivi per ARA. I nostri risultati, attualmente di difficile interpretazione, si pongono come contributo alla comprensione dei disordini immunitari e genetici presenti nella SSc, una malattia molto impegnativa dal punto di vista clinico e a patogenesi ancora sconosciuta.

BIBLIOGRAFIA

1. Majone F, Cozzi F, Tonello M *et al.* Unstabilized DNA breaks in lymphocytes of patients with different subsets of systemic sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1108: 240-8.
2. Majone F, Olivieri S, Cozzi F *et al.* Increased apoptosis in circulating lymphocyte cultures of anti-RNA polymerase III positive patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2009; 29:891-5.
3. Cozzi F. Sclerosi sistemica (scleroderma) in Malattie Reumatiche. Todesco S, Gambari PF eds, McGraw-Hill Publ 2002; 242-52.
4. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
5. Betterle C, Fabris F, Pedini B *et al.* Autoanticorpi nelle malattie del connettivo e reumatiche in Gli autoanticorpi: Manuale-Atlante a colori di Diagnostica. Betterle C eds; Piccin Publ 1997; 340-73.
6. Gonzales R, Storr M, Bloching H *et al.* Auto-antibody profile in progressive systemic sclerosis as a markers for oesophageal involvement. *J Clin Gastro-enterol* 2001; 32: 123-7.
7. Mchung NJ. Centroemre autoantibodies in Autoantibodies. Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL eds Elsevier Publ 2007; 151-7.
8. Hachulla E, Dubucquoi S. Nuclear auto-antibodies: a useful tool for the diagnosis, the classification and the prognosis of systemic sclerosis. *Le revue de medicine interne* 2004; 25: 442-7.

9. Yutaka O, Virginia DS, Thomas AM. Autoantibody Reactive with RNA Polymerase III in Systemic Sclerosis. *Annali of internal medicine* 1993; 119: 1005-13.
10. Harvey GR, Butts S, Rands AL *et al.* Clinical and serologic associations with anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 395-402.
11. Penn H, Howie AJ, Kingdon EJ *et al.* Scleroderma renal crisis: patient characteristics and long-term outcomes. *Q J M* 2007; 100: 485-94.
12. Khondkarian OA, Burak AI, Skobelsky MD. Chromosome complex in patients with disseminated sclerosis. *Vestn Akad Med Nauk SSSR* 1967; 22: 85-8.
13. Housset E, Emerit I, Baulon A *et al.* Anomalies chromosomiques dans la sclerodermie generalisee: un etude de dix malades. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1969; 269: 413-6.
14. Emerit I. Chromosomal breakage in systemic sclerosis and related disorders. *Dermatologica* 1976; 153: 145-56.
15. Pan SF, Rodnan GP, Deutsch M *et al.* Chromosomal abnormalities in progressive systemic sclerosis (scleroderma) with consideration of radiation effects. *J Lab Clin Med* 1975; 86: 300-8.
16. Powell FC, Schroeter AL, Winkelmann RK. Chromosome studies in scleroderma with consideration of centromere antibody status and assessment of possible in vitro clastogenic activity. *Acta Derm Venereol* 1986; 66: 414-8.
17. Wolff D, Needleman B, Wasserman S *et al.* Spontaneous and clastogen induced chromosomal breakage in scleroderma. *J Rheumatol* 1991; 18: 837-40.

18. Jabs EW, Tuck-Muller CM, Anhalt GJ *et al.* Cytogenetic survey in systemic sclerosis: correlation of aneuploidy with the presence of anticentromere antibodies. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 63: 169-75.
19. Galeazzi M, Anichini C, Morozzi G *et al.* Chromosomal abnormalities in peripheral lymphocytes from idiopathic Raynaud's phenomenon ts. *Clin Rheumatol* 1996; 15: 418-9.
20. Porciello G, Scarpato R, Storino F. Chromosome aberrations in Raynaud's phenomenon. *Eur J Dermatology* 2004; 14: 327-31.
21. Stummvoll GH, Aringer M, Smolen JS. Derangement of apoptosis-related lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2000; 39: 1341-50.
22. Kessel A, Rosner I, Rozenbaum M. Increased CD8+ T cell apoptosis in scleroderma is associated with low levels of NF-kappa B. *J Clin Immunol* 2004; 24: 30-6.
23. Kuwana M, Okano Y, Pandey JP. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-RNA polymerase III antibody. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2425-32.
24. Sokal P, Rohlf FJ. 1991. Biometry. Freeman. San Francisco
25. Majone F, Zamboni D, Cozzi F *et al.* Unstabilized DNA breaks in lymphocytes of patients with systemic sclerosis. *Eur. J. Dermatol* 2006; 16: 258-61.
26. Majone F, Luisetto R, Zamboni D *et al.* Ku protein as a potential human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax target in clastogenic chromosomal instability of mammalian cells. *Retrovirology* 2005; 2: 45.
27. Bailey SM, Meyne J, Cornforth M *et al.* A new method for detecting pericentric inversions using COD-FISH. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 75: 248-53.

28. Martin S G, Laroche T, Suka N *et al.* Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strands breaks in yeast. *Cell* 1999; 97: 621–33.
29. Matsumoto T, Fukui K, Niwa O *et al.* Identification of healed terminal DNA fragments in linear minichromosomes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 4424–30.
30. Franceschini F, Cavazzana I and Generali D. Anti Ku in connective tissue disease: clinical and serological evaluation of 14 patients. *J Rheumatol* 2002; 29: 1393–7.
31. Artlett CM, Black CM, Briggs DC *et al.* Telomere reduction in scleroderma patients: a possible cause for chromosomal instability. *J Rheumatol* 1996; 35: 732–7.
32. Wilkie AOM, Lamb J, Harris PC *et al.* A truncated human chromosome 16 associated with α -thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)_n. *Nature* 1990; 346: 868–71.
33. Emerit I, Filipe P, Meunier P *et al.* Clastogenic activity in the plasma of scleroderma patients: a biomarker of oxidative stress. *Dermatology* 1997; 194: 140–6.
34. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; 387: 147–63.
35. Kawanishi S, Hiraku Y and Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res* 2000; 488: 65–76.

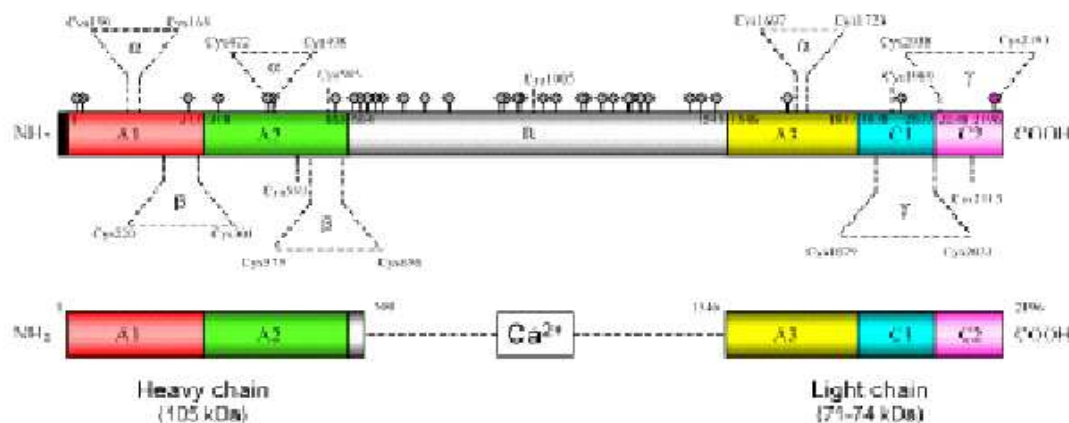


Figura 2. Struttura del fattore V e del fattore Va dopo attivazione da parte della trombina.

In letteratura è già stato dimostrato [6-9] che la proteina C è in grado di inattivare il fattore Va mediante differenti siti di proteolisi a livello degli amminoacidi Arg506, Arg306 e Arg679. Il primo sito di taglio è posizionato a livello di Arg506 ed è responsabile di una riduzione dell'attività del fattore Va pari al 25-40% e della riduzione della sua affinità con il fattore Xa. Il secondo sito di taglio è posizionato in Arg306 e causa la completa inattivazione del FVa. Infine il terzo sito situato in Arg 679 è di minore importanza e non è responsabile della inattivazione del FVa. Tramite la metodica dell'immunoblotting che prevede l'uso di un anticorpo che riconosce la catena pesante del fattore Va si può osservare che il primo sito di taglio produce una banda di circa 80 kDa (figura 3), mentre il secondo sito di taglio porta alla formazione di una banda di 60 kDa [6]. E' già stato dimostrato inoltre [6-7] che nella sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) esiste una resistenza alla APC.

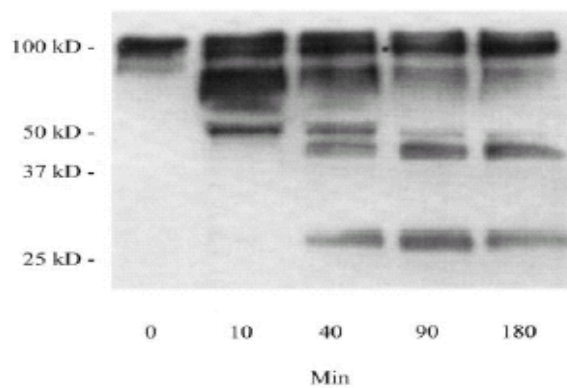


Figura 3. Western blot la banda da circa 100 kDa indica il fattore Va. Il taglio da partedella APC porta alla formazione di una banda di 80 kDa e successivamente di una banda da 60 kDa.

Tale processo può essere causato dalla competizione tra gli anticorpi antifosfolipidi e i fattori della coagulazione causando di conseguenza un'inibizione della proteina C attivata.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di riprodurre in vitro la stessa situazione che avviene in vivo in modo da poter approfondire il meccanismo e il livello di azione degli anticorpi antifosfolipidi nel processo di coagulazione del sangue che causa l'aumento della resistenza alla APC.

MATERIALI E METODI

Sede di esecuzione dei metodi di laboratorio

Tutte le tecniche di seguito indicate sono state effettuate presso il Laboratorio di Trombosi ed Emostasi, University Medical Center of Utrecht (Olanda), tra Febbraio e Agosto 2008.

Costruzione di un dimero di β_2 -glicoproteina I (β_2 -GPI)

In questo studio sono stati utilizzati due differenti tipi di dimeri della β_2 -GPI costruiti presso il laboratorio di trombosi ed emostasi di Utrecht (Olanda). Il primo dimero chiamato apple 4 consisteva in due molecole di β_2 -GPI create grazie alla dimerizzazione del dominio del fattore XI. Il secondo dimero era uguale al precedente ma con una mutazione a livello del dominio V della β_2 -GPI. Tale dimero chiamato W316S presenta una mutazione a livello dell'amminoacido 316 presente nel sito di legame della β_2 -GPI con i fosfolipidi [10-11].

Gel elettroforesi e immunoblotting

L'attivazione del fattore V da parte della trombina avviene incubando a 37° C e per 30 minuti una soluzione composta dal fattore V (10 μ g/ml) (purificato presso l'University Medical Center of Utrecht, Utrecht, Nederland), trombina a 10 nM, Hepes buffer (25 mM Hepes, 125 mM NaCl, pH=7,3), 0,1% albumin serum buffer (BSA), 24,5 μ M di vescicole di fosfolipidi (costituite da 20% fosfatidilcolina, 20% fosfatidilserina e 20% fosfatidiletanolamina, prodotte presso l'UMC, Utrecht, Nederland) [12] e da 3 mM CaCl_2 . Successivamente è stata aggiunta alla soluzione 20 nM di APC e sono stati prelevati campioni a intervalli di tempo da 0 a 120 minuti. Tali campioni sono stati diluiti in sample buffer e in ditiotritiolo (DTT) 1:50 e lasciati in ghiaccio. I campioni sono stati poi caricati sul gel di corsa dopo essere stati scaldati a 100° C, centrifugati e messi in ghiaccio. Il gel utilizzato è il gel di acrilamide al 10% composto da 5 ml di acrilamide 40% (Biorad, CA, USA), 9,6 ml di H_2O , 5 ml di Tris (Biorad) 1,5 M a pH=8,8, 200 μ l di ammoniopersolfato (APS) (Biorad) al 30%, 200 μ l di sodiododecilsolfato (SDS) (Biorad) al 10% e 20 μ l di Temed (Biorad). Lo staking gel è stato fatto da una soluzione composta da 1 ml di acrilamide al 40%, 6,3 ml di H_2O , 2,5 ml di Tris 0,5

M a pH=6,9, 100 µl di APS al 30%, 100 µl di SDS al 10% e 20 µl di Temed. Il tampone di corsa utilizzato era il tampone 1X ottenuto diluendo in H₂O la soluzione 10X composta da 30,3 grammi di Tris, 144 g di glicina al quale sono stati aggiunti 50 ml di SDS al 10%. Dopo aver lasciato correre il gel per circa 1,5 h a 200 V si procede con l'immunoblotting. Come gel di corsa per l'immunoblotting si applica una corrente a 125 V per 1h a 4°C utilizzando una soluzione composta da 200 ml di etanolo/metanolo, 700 ml di H₂O e 100 ml di 1X blotbuffer (la soluzione 10X di blotbuffer è formata da 122 g di glicina e 24,2 di Tris). Alla fine della corsa il foglio di nitrocellulosa è incubato con 5 ml di soluzione di bloccaggio (Biorad) e 5 ml di TBS 1X. Dopo un ulteriore lavaggio con TBS 1X /0,1% Tween-20 (Biorad) si lascia ad incubare la nitrocellulosa per tutta la notte a 4°C. il giorno successivo si aggiunge l'anticorpo anti-FV (Dako, Glostrup, Denmark) per 1 h a 4°C e dopo 5 lavaggi con TBS/Tween si aggiunge il secondo anticorpo fluoresceinato (Dako, Glostrup, Denmark) lasciandolo incubare per 1 h al buio. L'elettroforesi su gel di acrilamide è stata inoltre eseguita aggiungendo alla soluzione il dimero apple 4 e il dimero W316S che presenta la mutazione nel sito di legame con i fosfolipidi.

Thrombin generation assay

Per l'esecuzione di questo test sono state utilizzate piastre Costar 2595 (Cambridge, MA, USA). Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 24 µl di normal pool plasma, 6 µl di una soluzione composta da vescicole di fosfolipidi, 12,5 mM CaCl₂, tissue factor diluito 1:1000, APC 10 nM e 30 µl di substrato fluorogenico presente nel kit commerciale (Technothrombin TGA, Technoclone, Austria) [13]. Tale kit commerciale permette di osservare nel tempo la formazione della trombina. Lo stesso test è stato eseguito aggiungendo concentrazioni scalari del dimero apple 4 e del dimero W316S.

Test ELISA legame dimeri ai fosfolipidi

Le piastre Maxisorp (Nunc, Roskilde, Denmark), dopo essere state seminate con vescicole di fosfolipidi (20% fosfatidilcolina, 20% fosfatidilserina e 20% fosfatidiletanilamina) e messe a incubare a 37°C per 1 h, sono state incubate per 2 h a 37°C con una soluzione composta da TBS in 0,5% gelatina. Dopo un primo

lavaggio con TBS 1X le piastre sono state incubate con differenti concentrazioni (variabili da 0 a 40 $\mu\text{g/ml}$) di $\beta_2\text{-GPI}$, differenti concentrazioni del dimero apple 4 e del dimero W316S per 1,5 h a 37°C. Successivamente le piastre sono state incubate con 100 μl di una soluzione composta dall' anticorpo monoclinale (3B7) (purificato presso l'University Medical Center of Utrecht) alla concentrazione di 1 $\mu\text{g/ml}$ e successivamente è aggiunto il secondo anticorpo di coniglio coniugato a perossidasi (Dako, Glostrup, Denmark) diluito 1:1000. La lettura è stata eseguita dopo aver aggiunto alla soluzione TMB (tetrametilbenzidina, Vector Laboratories, CA, USA) e H_2SO_4 1M.

RISULTATI

Test ELISA legame dimeri ai fosfolipidi

Grazie alla metodica dell'ELISA precedentemente descritta abbiamo notato che il dimero della β_2 -GPI lega con più avidità le vescicole di fosfolipidi (figura 4). Ciò sembrerebbe quindi confermare una delle ipotesi presenti in letteratura, la quale sostiene che la β_2 -GPI prima di legarsi ai fosfolipidi di membrana va incontro a dimerizzazione. Il dimero W316S che presenta la mutazione a livello del dominio V della β_2 -GPI non si lega ai fosfolipidi.

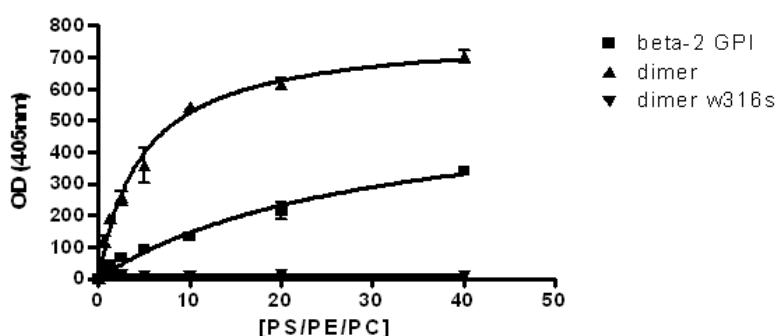


Figura 4. Legame della β_2 -GPI, del dimero W316S e del dimero apple 4 a vescicole di fosfolipidi.

Gel elettroforesi e immunoblotting

Successivamente tramite la tecnica dell'immunoblotting è stato valutato il meccanismo di azione della APC e la resistenza della APC in presenza del dimero apple 4. Tale dimero mima in vitro ciò che si verifica nel momento in cui gli anticorpi antifosfolipidi legano i fosfolipidi di membrana. Questi anticorpi, infatti, portano alla formazione di un dimero della β_2 -GPI, il quale si lega ai fosfolipidi di membrana e causa una cascata di reazioni responsabili della formazione della trombosi. La figura 6 mostra che il taglio completo del fattore V attivato da parte della APC avviene dopo 5 minuti di incubazione di una soluzione contenente FV, trombina e APC. Se alla soluzione viene aggiunto il dimero apple 4 il taglio del FVa avviene dopo 20 min, mentre se alla soluzione viene aggiunto il dimero W316S il taglio avviene nell'intervallo di tempo tra 5 e 10 min.

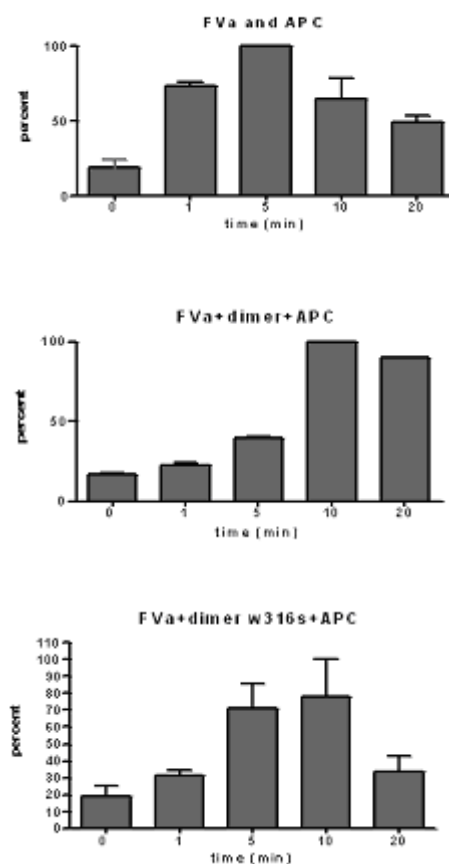


Figura 6. Taglio del FVa da parte della APC in una situazione normale, in presenza del dimero apple 4 e in presenza del dimero W316S. La percentuale indica quante volte la APC taglia il FVa a intervalli di tempo prestabiliti ed è stata calcolata dopo aver ripetuto lo stesso esperimento almeno tre volte. L taglio massimo corrisponde al valore di 100.

Come controllo abbiamo considerato soluzioni contenenti il FVa, l'APC e solo la β_2 -GPI, oppure solo gli anticorpi monoclonali (MoAb), oppure solo gli anticorpi purificati dai pazienti con sindrome da anticorpi antifosfolipidi. In tutti questi tre casi il taglio del FVa da parte dell'APC avveniva molto velocemente e ciò rappresentava la situazione di perfetto funzionamento dell'APC nel sistema di coagulazione del sangue. Se alle soluzioni si aggiungeva β_2 -GPI e MOAb oppure

β_2 -GPI e anticorpi purificati dai pazienti il taglio del FV avveniva dopo 5 minuti (figura 7).

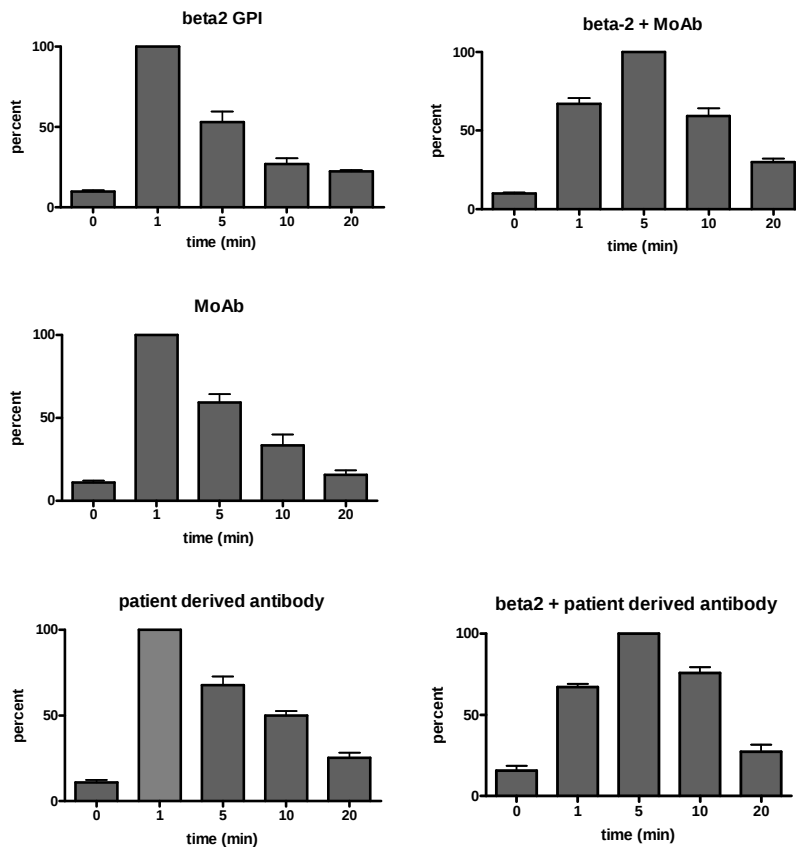


Figura 7. Taglio del FVa da parte della APC nei controlli. La percentuale indica quante volte la APC taglia il FVa a intervalli di tempo prestabiliti ed è stata calcolata dopo aver ripetuto lo stesso esperimento almeno tre volte.

Thrombin generation assay

Un'altra tecnica utilizzata è stata la thrombin generation assay, la quale permette di vedere nel tempo la formazione della trombina. Come si può vedere nella figura 8 in presenza di APC (10 μ g/ml) la formazione della trombina inizia più tardi nel tempo e l'area sotto la curva è significativamente minore.

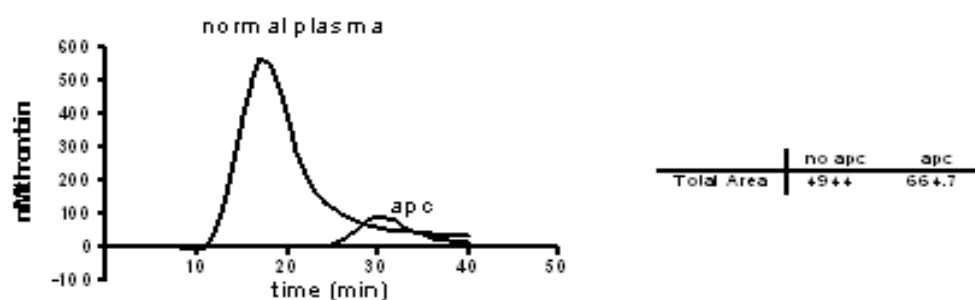


Figura 8. Generazione della trombina nel plasma normale e in presenza di APC mediante tecnica di thrombin generation assay.

In figura 9 è rappresentata l'azione della APC in differenti situazioni. Alla reazione precedente è stata infatti aggiunta della β_2 -GPI, degli anticorpi monoclonali e anticorpi purificati dai pazienti. Come si può osservare dal grafico sotto riportato la APC non riesce a svolgere la sua completa azione in presenza di anticorpi monoclonali o di anticorpi purificati dai pazienti. In questi ultimi casi la comparsa della trombina e del conseguente trombo avviene più velocemente nel tempo.

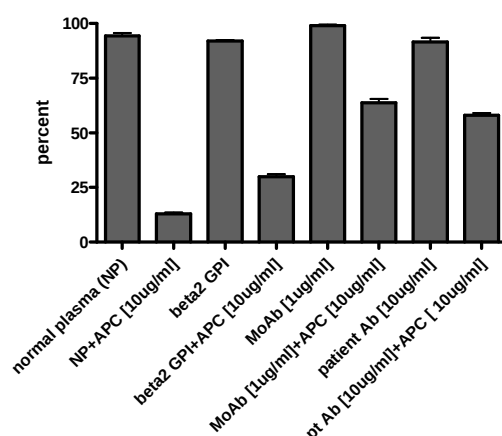


Figura 9. Azione dell'APC in differenti situazioni: con plasma normale e plasma con APC ad una concentrazione standard di 10 μ g/ml, con β_2 -GPI in presenza e assenza di APC, con MoAb in presenza e assenza di APC e con anticorpi purificati dai pazienti in presenza e assenza di APC.

Come ultimo test abbiamo valutato l'azione dell'APC variando sia la concentrazione del dimero apple 4 e del dimero W316S sia la concentrazione dell'APC. Abbiamo pertanto notato che aumentando la concentrazione di entrambi i dimeri nella soluzioni e mantenendo la concentrazione dell'APC costante è evidente la resistenza alla proteina C attivata anche a basse dosi di dimero (figura 10).

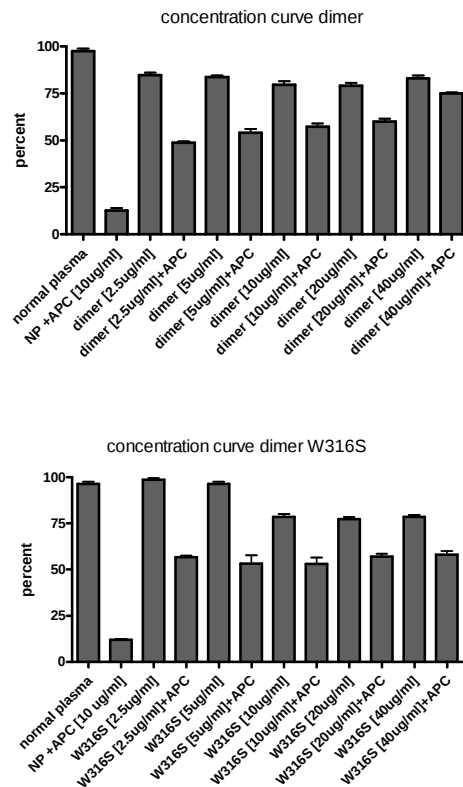


Figura 10. Azione della proteina C attivata in soluzioni con differenti concentrazioni di apple 4 e W316S.

Inoltre, aumentando la concentrazione dell'APC e mantenendo costante le concentrazioni di apple 4 e del dimero W316S abbiamo notato che anche ad alte concentrazioni di APC esiste una resistenza alla proteina C attivata (figura 11).

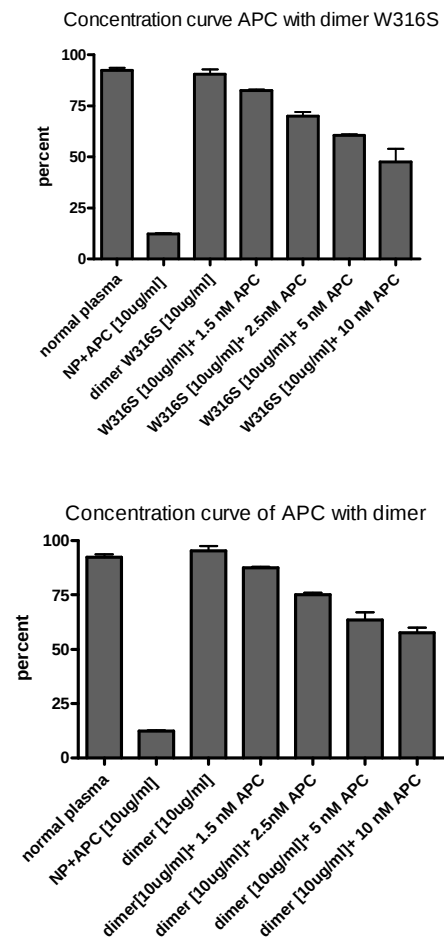


Figura 11. Azione della proteina C attivata in soluzioni con differenti concentrazioni di APC.

DISCUSSIONE

E' già stato dimostrato in letteratura che nell'APS esiste un aumento della resistenza alla proteina C attivata, la quale pertanto non può svolgere la sua funzione anticoagulante degradando il fattore V attivato. Nel nostro lavoro ci siamo chiesti se in assenza del legame con i fosfolipidi (PL) esisteva comunque tale resistenza all'APC. A questo scopo abbiamo utilizzato due dimeri di β_2 -GPI: il primo (apple 4) si legava agli PL mentre il secondo chiamato W316S presentava una mutazione nel sito di legame con gli PL. Grazie alle metodiche di gel elettroforesi e Western blot abbiamo osservato che in presenza sia del dimero apple 4 che del dimero W316S esisteva un ritardo nel taglio della APC nei confronti del fattore V attivato. Questi dati sembrano dimostrare che il legame con i fosfolipidi non è essenziale affinché gli anticorpi possano svolgere la propria attività trombotica, infatti anche in presenza del dimero W316S che non lega i fosfolipidi il fattore Va non veniva inattivato. Per dimostrare questa ipotesi abbiamo utilizzato anche la metodica chiamata thrombin generation assay che permette di osservare nel tempo la formazione della trombina. I risultati ottenuti mettono in evidenza il fatto che in presenza di entrambi i dimeri della β_2 -GPI esiste una resistenza alla proteina C attivata. Aumentando, inoltre, la concentrazione della APC si può osservare un minor effetto trombotico anche se la resistenza alla proteina C attivata rimane presente anche nella soluzione contenente plasma a cui è stato aggiunto il dimero W316S.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti sembrano dimostrare che il legame con i fosfolipidi non è così essenziale affinché gli anticorpi possano svolgere la propria attività trombotica; infatti anche in presenza del dimero W316S che non lega i fosfolipidi il fattore Va non viene inattivato. Ulteriori studi sono necessari al fine di comprendere meglio il meccanismo di azione degli anticorpi antifosfolipidi in presenza di proteine con attività anticoagulanti come la APC.

BIBLIOGRAFIA

1. Villoutreix B, Dahlback B. Structural investigation of the A domains of human blood coagulation factor V by molecular modeling. *Protein Science* 1998; 7: 1317-1325.
2. Esmon CT. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost* 1993; 70: 29-35.
3. Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26486-26491.
4. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS *et al.* The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10212-10216.
5. Duga S, Asselta R, Tenchini ML. Coagulation factor V. *International J Biochem Cell Biol* 2004; 36:1393-1399.
6. Van der Neut Kolfschoten M, Dirven RJ, Vos HL *et al.* Factor Va is inactivated by activated protein C in the absence of cleavage sites at Arg-306, Arg-506, and Arg-679. *J Biol Chem* 2004; 279: 6567-6575.
7. Heeb MJ, Rehemtulla A, Moussalli M *et al.* Importance of individual activated protein C cleavage site regions in coagulation Factor V and Factor Va inactivation and for Factor Xa activation. *Eur J Biochem* 1999; 260: 64-75.
8. Gale A, Tsavaler A, Griffin JH. Molecular characterization of an extended binding site for coagulation Factor Va in the positive exosite of activated protein C. *J Biol Chem* 2002; 277: 28836-28840.

9. Gale A, Heeb MJ, Griffin JH. The autolysis loop of activated protein C interacts with factor Va and differentiates between the Arg506 and Arg306 cleavage sites. *Blood* 2000; 96: 585-593.
10. Horbach DA, Van Oort E, Tempelman MJ *et al.* The prevalence of a non-phospholipid-binding form of β_2 -glycoprotein I in human plasma. Consequences for the development of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies. *Thromb Haemost* 1998; 80: 791-797.
11. Meijers JC, Mulvihill ER, Davie EW *et al.* Apple four in human blood coagulation factor XI mediates dimer formation. *Biochemistry* 1992; 31: 4684.
12. Brunner J, Skrabal P, Hauser H. Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physio-chemical properties. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455:322-331.
13. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R *et al.* Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33: 4-15.

INFLUENZA DEI DIVERSI VALORI DI CUT-OFF DEGLI ANTICORPI ANTICARDIOLIPINA DI CLASSE G SULLA DIAGNOSI DI SINDROME DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI. [1]

INTRODUZIONE

La Sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è una malattia sistemica di origine autoimmune caratterizzata da fenomeni trombotici, complicanze ostetriche e dalla presenza nel sangue di un gruppo eterogeneo di autoanticorpi diretti contro complessi proteina-fosfolipide o i singoli componenti (fosfolipidi anionici e proteine come la β_2 Glicoproteina I, la protrombina e l'annexina V). Anche se l'epidemiologia non è ancora stata ben definita è stato accertato che l'APS prevale nelle donne rispetto agli uomini con un rapporto 5:1 ed è presente nel 10-20% delle donne affette da abortività da causa sconosciuta.

Gli anticorpi antifosfolipidi (aPL) più attualmente ricercati nella pratica clinica sono:

- il lupus anticoagulant (LA)
- gli anticorpi anti-cardiolipina (aCL)
- gli anticorpi anti-beta2 glicoproteina I (anti- β_2 GP1)

Questi autoanticorpi si associano a trombosi venose, arteriose o del microcircolo in qualsiasi distretto corporeo e/o a perdite di gravidanza attraverso meccanismi non ancora ben definiti.

Studi più recenti mostrano che gli aPL associati alle manifestazioni cliniche dell'APS non reagiscono direttamente con i fosfolipidi anionici, bensì con proteine o complessi proteina-fosfolipide. Tra queste proteine bersaglio le più studiate sono la beta-2 glicoproteina I, la protrombina e l'annexina V.

Nonostante il termine "Sindrome da anticorpi antifosfolipidi" sia stato utilizzato per la prima volta nel 1987 [2] bisogna giungere al 1998 per avere i primi criteri "preliminari" ufficialmente accettati per la classificazione della Sindrome da anticorpi antifosfolipidi. Essi sono stati elaborati nell'ambito dell'ottavo Simposio Internazionale sugli aPL tenuto a Sapporo in Giappone e pubblicati nel 1999 [3].

Successivamente con l'inserimento degli anti- β_2 GPI tra i criteri diagnostici per l'APS sono stati elaborati durante il nono Simposio Internazionale sugli aPL tenuto a Sidney nel 2004 i nuovi e attuali criteri sulla sindrome, i quali, sono stati pubblicati nel 2006 [4]. In particolare gli anti- β_2 GPI di classe IgG si erano rivelati altamente sensibili per l'impegno ostetrico, al pari degli aCL-IgG; mentre i LA risultavano avere elevata specificità ma scarsa sensibilità [5].

Lo scopo dell'aggiornamento dei criteri di classificazione è quello di fornire dei requisiti rigidi e inconfutabili per poter creare dei gruppi di pazienti assolutamente omogenei e adatti così alla elaborazione di studi controllati [4, 6].

I nuovi criteri di Sydney consentono di definire un paziente affetto da APS quando esiste la presenza di almeno un criterio clinico e uno di laboratorio.

CRITERI CLINICI

1. Trombosi Vascolari: Uno o più episodi di trombosi arteriose, venose o dei piccoli vasi, in qualsiasi tessuto od organo. Le trombosi devono essere confermate da studi di imaging o istopatologici. Per la conferma istopatologica, le trombosi dovrebbero essere presenti senza significativa flogosi della parete vasale.
2. Impegno ostetrico:
 - a) una o più morti fetali da causa sconosciuta avvenute dalla 10^a settimana gestazionale (SG) in poi con morfologia fetale normale documentata dall'ecografia o dall'esame macroscopico del feto
 - b) una o più nascite di neonati morfologicamente normali $\leq$ 34^a SG causate da severa preeclampsia o eclampsia (seguendo le definizioni standard), o severa insufficienza placentare,
 - c) tre o più aborti spontanei consecutivi da causa sconosciuta prima della 10^a SG. Devono essere escluse anomalie materne di tipo anatomico od ormonale ed alterazioni cromosomiche materne e paterne.

CRITERI DI LABORATORIO:

1. Presenza nel plasma di lupus anticoagulant, in due o più determinazioni eseguite ad almeno 12 settimane di distanza, in accordo con le linee guida della Società Internazionale di Trombosi ed Emostasi (subcomitato scientifico sul LA/anticorpi fosfolipide-dipendenti) (citare la voce bibliografica)

2. Presenza nel sangue di anticorpi anticardiolipina, di classe IgG e/o IgM, a medio o ad alto titolo (>40 GPL/MPL oppure $>99^{\circ}$ percentile), in due o più determinazioni eseguite ad almeno 12 settimane di distanza con metodo ELISA standardizzato
3. Presenza nel sangue di anticorpi anti- β_2 GPI, di classe IgG e/o IgM, a medio o ad alto titolo ($>99^{\circ}$ percentile), in due o più determinazioni eseguite ad almeno 12 settimane di distanza con metodo ELISA standardizzato secondo le procedure raccomandate

I nuovi criteri prevedono anche la suddivisione dei soggetti con aPL in base alla loro positività anticorpale. Essi vengono pertanto suddivisi in 4 categorie [2-7]:

- I positività per più di un anticorpo in qualsiasi combinazione
- IIa positività isolata per LAC
- IIb positività isolata per aCL
- IIc positività isolata per β_2 GPI

Tale suddivisione è giustificata da studi che dimostrano che la positività plurima è associata a maggiore severità delle manifestazioni cliniche e ad una maggiore frequenza di perdite fetali [8].

La conferma della presenza di aPL è molto importante poiché il quadro clinico della sindrome (trombosi e/o impegno ostetrico) può essere sostenuto anche da altre cause. La costanza della positività degli aPL nel tempo associa con maggior sicurezza le manifestazioni cliniche alla presenza dell'APS. Risulta inoltre importante che la determinazione degli aPL avvenga in modo preciso per evitare errori di interpretazione. Tuttavia, mancano a livello internazionale, delle metodiche standardizzate per la determinazione degli aPL, pertanto spesso nei diversi Centri si ottengono risultati differenti testando gli stessi campioni. Numerosi sono gli sforzi che si stanno compiendo per cercare di contribuire ad una conoscenza più approfondita di questi anticorpi, adottare le condizioni di lavoro più appropriate per una corretta determinazione [9-11].

Per quanto concerne la determinazione degli aCL i criteri di Sidney prevedono l'uso di due differenti valori di cut-off, il 99° percentile e le 40 unità. Scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare l'influenza di questi due valori di cut-off sulla classificazione di pazienti affetti da APS prendendo in considerazione un largo gruppo di pazienti APS che afferiscono al nostro centro.

PAZIENTI E METODI

Pazienti e controlli

Nel nostro studio sono stati considerati 140 pazienti affetti da APS primaria che soddisfacevano i criteri di Sidney [4]. Le caratteristiche cliniche dell'APS erano la trombosi vascolare e/o l'impegno ostetrico, mentre i criteri di laboratorio includevano la presenza di anticorpi LA e/o IgG/IgM α - β_2 GPI e/o IgG/IgM aCL a titolo medio/alto utilizzando il 99° percentile come valore di cut-off. Per calcolare il 99° percentile sono stati testati 100 soggetti sani omogenei per sesso e per età con i pazienti.

Test per la determinazione degli aPL

La presenza di anticorpi anticardiolipina IgG/IgM sono stati testati utilizzando un ELISA "in-house" che seguiva i requisiti base precedentemente descritti che sono stati proposti durante il Forum Europeo degli anticorpi antifosfolipidi [11].

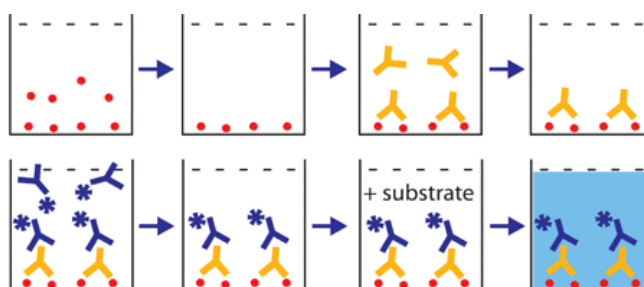


Figura 3: Schema del metodo ELISA

Le piastre Polysorp (Nunc, Rokilde, Denmark), dopo essere state seminate con cardiolipina (Sigma, St Louis, Mo, USA) e lasciate in frigo a 4°C per tutta la notte, sono state incubate per 2 h a temperatura ambiente con una soluzione composta da 10% di FCS/PBS (fetal calf serum/phosphate buffered saline). Dopo un primo lavaggio con 10% FCS/PBS le piastre sono state incubate con i sieri dei pazienti diluiti 1:50 per 1h e successivamente lavate 3 volte con la soluzione al 10% di FCS/PBS. Le piastre sono state pertanto incubate con 100µl di una soluzione composta da anticorpi di capra antihuman IgG e antihuman IgM coniugati a

fosfatasi alcalina (Sigma) per 1.5h. I pozzetti vengono poi lavati e incubati a 37°C con *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma). L'enzima, reagendo con questo substrato provoca una conversione colorimetrica proporzionale alla concentrazione dell'anticorpo presente, la quale viene rilevata dallo spettrofotometro come valore di assorbanza. I valori di assorbanza ottenuti, espressi in densità ottica (OD), vengono trasformati in unità confrontandoli con una curva di calibrazione costruita tramite diluizioni a scalare di uno standard noto.

L'assorbanza viene poi letta a 405 nm utilizzando un lettore per micropiatte (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). In accordo con le raccomandazioni del Forum Europeo sono stati usati come controlli esterni 2 diluizioni ben definite di anticorpi HCA1 e EY2C9. Inoltre, i calibratori LAPL GM-200 (Louisville APL Diagnostics, Inc, Doraville, GA, USA) sono stati utilizzati per creare le curve di calibrazione [12].

La presenza di anticorpi lupus anticoagulant è stata testata tramite dei clotting test seguendo i suggerimenti internazionali forniti dalla società di trombosi ed emostasi [13,14]. Le tecniche emocoagulative sono dirette contro proteine plasmatiche con alta affinità per i fosfolipidi come la β 2-glicoproteina I (β 2-GPI) e la protrombina. Queste proteine dopo essersi legate agli anticorpi competono con i fattori della coagulazione per il legame con la superficie fosfolipidica. In questo modo in presenza di LA i tempi dei tests emocoagulativi fosfolipide-dipendenti risultano allungati. Tuttavia per escludere falsi positivi dovuti alla presenza di inibitori, è necessario integrare i tests di screening con le prove di mixing e di conferma [15]. Il plasma da esaminare, ottenuto da sangue venoso, viene raccolto in una provetta contenente citrato di sodio 0,109 M in rapporto 9:1 e successivamente centrifugato a temperatura ambiente (per 10 minuti a 3000 giri). Si raccoglie solo la metà superiore del supernatante ottenendo un plasma povero di piastrine, le quali andrebbero a neutralizzare gli eventuali LA.

Il LA è stato determinato usando il tempo del veleno di vipera di Russel diluito (dRVVT) che attiva direttamente il fattore X in presenza di fosfolipidi a bassa concentrazione e calcio e il tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT), che attiva la via intrinseca della coagulazione. I tempi vengono misurati, in secondi, da uno strumento apposito (ACL7000, Instrument Laboratory). I plasmi positivi

al test di screening, dRVVT e/o aPTT, vengono poi valutati con il test di mixing e a loro volta i positivi al mixing vengono valutati con il test di conferma (figura 1). I cut-off sono determinati utilizzando 20 plasmi di donatori abituali di sangue ed espressi come media in secondi + 2.5 DS.

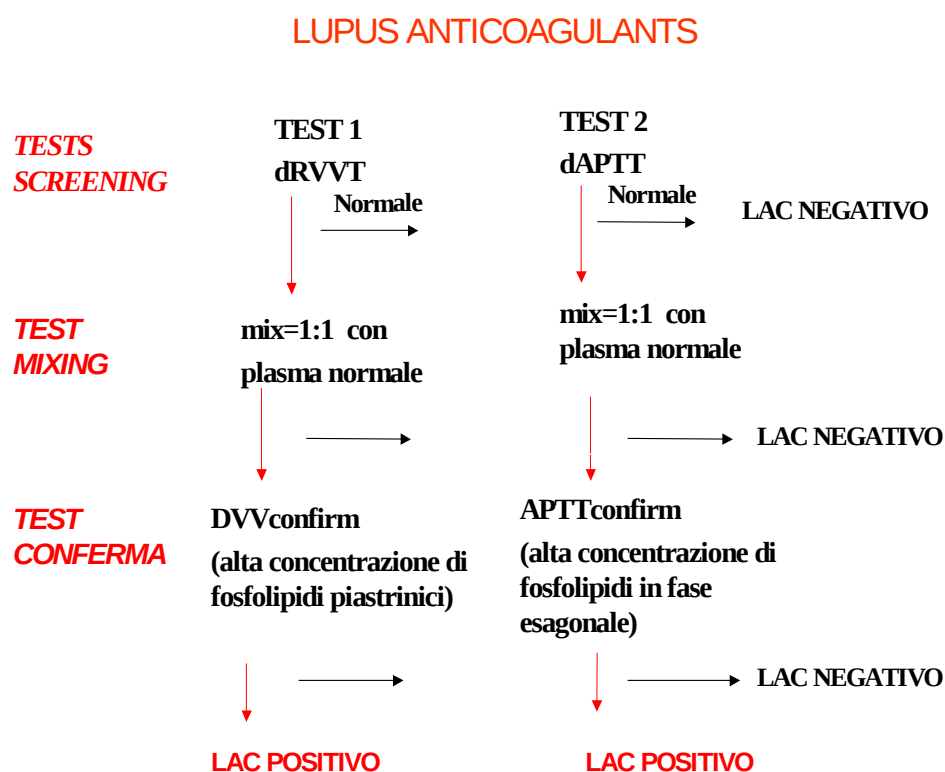


Figura 1. Schema dei tests emocoagulativi per la determinazione dei LAC.

Metodo ELISA per la determinazione degli anticorpi $\alpha\beta_2$ GPI

Per la determinazione degli anticorpi $\alpha\beta_2$ GPI di classe IgG ed IgM si utilizza il metodo immunoenzimatico ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, eseguito in accordo alle raccomandazioni Internazionali indicate dal European Forum on aPL [10]. Per creare la curva di calibrazione sono stati utilizzati anticorpi monoclonali di Koike per gli $\alpha\beta_2$ GPI (HCAL per le IgG e EY2C9 per le IgM) [16]. Nella prima giornata si semina l'antigene utilizzando piastre Maxisorp a fondo piatto a 96 pozzetti (c). La β_2 GPI purificata home-made è diluita in una soluzione tampone di carbonato di calcio 0,05 M, (pH 9,6), ottenendo una concentrazione di antigene di 10 $\mu\text{g/ml}$. In ogni pozzetto si seminano 100 μl di

soluzione, corrispondenti a 1µg di β_2 GPI. Le piastre vengono lasciate in frigo (+4°C) *overnight*. Il giorno successivo si seminano 150 µl di PBS-BSA 1% per pozzetto (PBS=phosphate buffer saline; BSA= bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, USA) e le piastre vengono incubate per un'ora, coperte, al buio, a temperatura ambiente. Nel frattempo i sieri da testare e due sieri di controllo (uno per IgG e uno per IgM) vengono diluiti in rapporto 1:100 in PBS-Tween 0.05%. Scaduta l'ora di incubazione i sieri diluiti vengono seminati in doppio in ogni piastra. Le piastre vengono incubate per due ore a temperatura ambiente. Dopo due ore di incubazione si svuotano le piastre e si effettuano 3 lavaggi con 150 µl di PBS-Tween per pozzetto; quindi si seminano 100 µl/pozzetto di immunoglobuline anti-IgG e anti-IgM, coniugate con fosfatasi alcalina (Sigma-Aldrich, USA) per 2 ore. Di seguito si effettuano tre lavaggi delle piastre con 150 µl di PBS-Tween e si seminano 100 µl/pozzetto di PNF (Sigma-Aldrich, USA), precedentemente diluito in tampone Mg-carbonato a pH 9.8; si incubano le piastre a 37° e si esegue la lettura al fotometro a luce verticale (Flow Laboratories, USA) a lunghezza d'onda di 405 nm e si interpretano i risultati, tramite elaborazione con programma software (Melisa Microplate manager, Walker Laboratories, UK), secondo i cut-off vigenti, calcolati con lo stesso procedimento usato per gli aCL.

Analisi statistica

Il paired-sample t-test è stato utilizzato per calcolare la variabilità intra e inter test. Il test del chi quadro di Pearson è stato impiegato per confrontare i risultati in differenti gruppi di pazienti IgG aCL positivi. I valori medi in GPL nei gruppi di pazienti sono confrontati usando il test one-way ANOVA e il post hoc multiple comparisons. La relazione tra trombosi e impegno ostetrico con un valore di cut-off >40 GPL è stato analizzato calcolando il crude odds ratio (OR) e l'intervallo di confidenza (CI) al 95%.

RISULTATI

In base al valore di cut-off calcolato analizzando 100 soggetti sani (99° percentile era: 17,4 per IgG e 26,8 per IgM), 107 dei 140 pazienti studiati erano positivi per gli anticorpi aCL. Di questi 107 pazienti, 72 erano positivi solo per IgG aCL, 17 solo per IgM aCL e 18 per entrambi gli isotipi (IgG +IgM). Questo ultimo gruppo di pazienti sono stati conteggiati sia nel gruppo IgG che nel gruppo IgM (figura 2). I pazienti positivi per aCL IgM non sono stati considerati in quanto il gruppo era troppo piccolo e i risultati non avevano significato statistico. Il nostro gruppo di studio includeva, pertanto, 90 pazienti positivi per aCL IgG. La tabella I mostra la popolazione di studio stratificata in base al profilo anticorpale e alle caratteristiche cliniche. Dopo aver testato 90 pazienti abbiamo visto che 64 (71%) avevano titoli anticorpali sopra i 40 GPL, mentre i rimanenti 26 avevano titoli anticorpali compresi tra il 99° percentile (17,4 GPL) e le 40 unità.

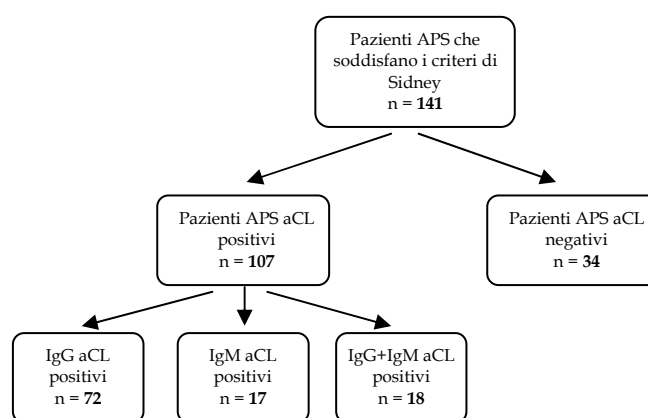


Figura 2. Popolazione di studio suddivisa in base alla positività per la cardiolipina e all'isotipo IgG.

	Impegno ostetrico	Trombosi	Entrambi	Totale
Solo IgG aCL	13	9	2	24
IgG aCL+LA or α - β_2 GPI	3	18	2	23
IgG aCL+LA+ α - β_2 GPI	3	32	8	43
Totale	19	59	12	90

Tabella I. Popolazione di studio stratificata in base al profilo anticorpale e alle caratteristiche cliniche.

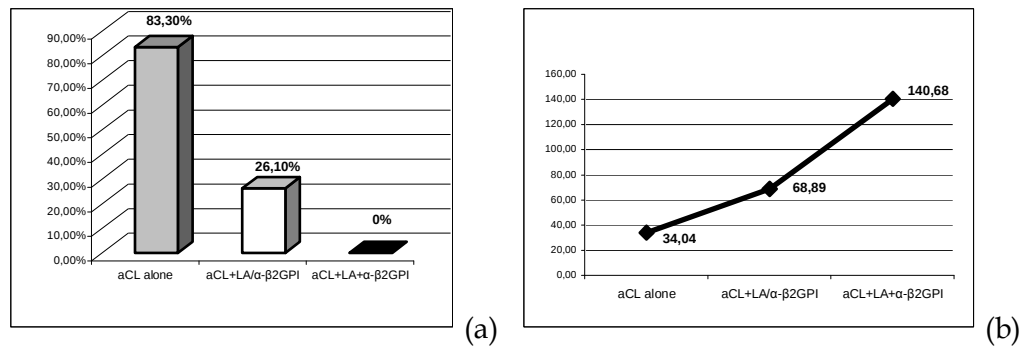


Figura 3. (a) Prevalenza (%) di pazienti APS IgG aCL positivi con un valore di ACL tra il 99° percentile e le 40 unità (b) Valore anticorpale medio nei pazienti APS IgG aCL positivi suddivisi in base al profilo anticorpale.

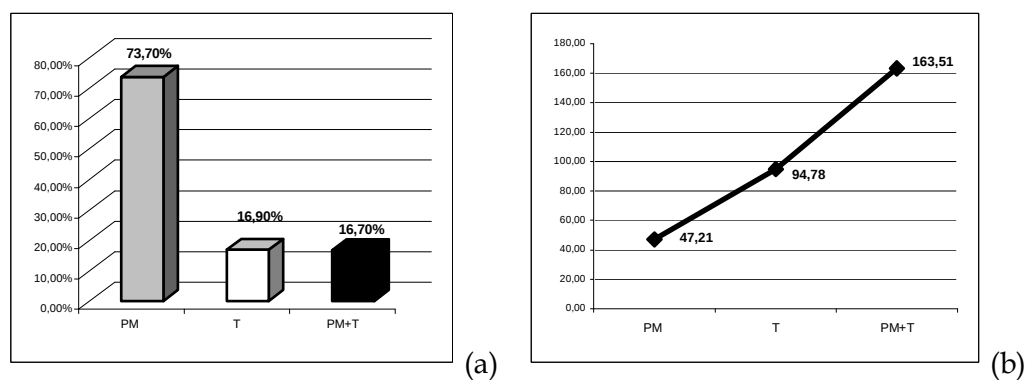


Figura 4. (a) Prevalenza (%) di pazienti APS IgG aCL positivi con un valore di ACL tra il 99° percentile e le 40 unità (b) Valore anticorpale medio nei pazienti

APS IgG aCL positivi suddivisi in base alle caratteristiche cliniche. PM=impegno ostetrico, T=trombosi, PM+T=impegno ostetrico + trombosi.

Come si può vedere nella figura 3a, 20 dei 24 pazienti positivi solo per aCL IgG (83,3%) avevano un valore in GPL tra il 99° percentile e le 40 unità. Se prendiamo in considerazione, quindi, solo il cut-off > 40 unità questi pazienti non vengono più considerati affetti da sindrome da anticorpi antifosfolipidi. Inoltre, 6 dei 23 pazienti con doppia positività (26,1%) avevano un valore anticorpale in GPL compreso tra il 99° percentile e le 40 unità e, pertanto, considerando solo il cut-off > 40 unità questi pazienti cambiavano categoria anticorpale passando da I a II. Il titolo anticorpale dei 43 pazienti con triplice positività, invece, era per tutti maggiore delle 40 unità. Una differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra i tre gruppi di pazienti ($P < 0,0001$).

Il valore medio ($\pm$ DS) (figura 3b) per i pazienti positivi solo per la cardiolipina di isotipo IgG era 34,0 ($\pm$ 16,0), 68,8 ($\pm$ 29,2) nei pazienti positivi per aCL IgG con LA o α - β_2 GPI e 140,6 ($\pm$ 93,7) nei pazienti positivi per aCL IgG, LA e α - β_2 GPI. Il confronto tra i tre gruppi di pazienti era statisticamente significativo ($p < 0,0001$).

Per quanto riguarda le caratteristiche cliniche (figura 4a) 14 pazienti su 19 (73,7%) con solo impegno ostetrico, 10/59 (16,9%) con solo trombosi vascolare e 2/12 (16,6%) con entrambe le caratteristiche avevano un valore anticorpale di aCL IgG compreso tra il 99° percentile e le 40 unità. Anche in questo caso la differenza tra i tre gruppi di pazienti era statisticamente significativa ($P < 0,0001$). Inoltre, il valore medio di aCL IgG in questi tre gruppi di pazienti (figura 4b) era 47,2 ($\pm$ 46,3), 94,7 ($\pm$ 61,7) e 163,5 ($\pm$ 144,1), rispettivamente e la loro differenza era statisticamente significativa ($p < 0,0001$). L'analisi univariata mostra una significativa crude OR (13,8 ; 95% CI, 4,2-45,5) per l'associazione tra trombosi e valori più alti delle 40 unità e una significativa crude OR (0,2 ; 95% CI, 0,1-0,5) per l'associazione tra impegno ostetrico e valori inferiori alle 40 unità.

DISCUSSIONE

Lo scopo del nostro studio è stato quello di verificare se, come proposto durante la conferenza di Sidney 2004, si poteva usare come valore di cut-off degli anticorpi aCL sia un titolo anticorpale maggiore del 99° percentile sia un titolo maggiore delle 40 unità GPL. Il test ELISA per gli anticorpi anti aCL è stato eseguito utilizzando le linee guida consigliate durante il forum europeo degli anticorpi antifosfolipidi. Pertanto si è utilizzata una curva di calibrazione a 8 punti utilizzando i sieri di Harris e, per garantire risultati validi si sono utilizzati standard internazionali come controlli esterni. Il valore del 99° percentile, calcolato sulla base dei risultati ottenuti testando 100 soggetti sani e omogenei per sesso e per età con i pazienti, è stato usato prima di tutto per selezionare i pazienti APS positivi per gli anticorpi IgG aCL. Tra questi 90 pazienti, 64 avevano un titolo anticorpale sopra le 40 unità GPL, mentre i rimanenti 26 avevano un titolo anticorpale tra il 99° percentile e le 40 unità GPL. Inoltre 20 di questi 26 pazienti erano positivi solo per anticorpi aCL di tipo IgG e, pertanto, da un lato potrebbero non essere più trattate come sindromi se si considera il valore di cut-off > 40 unità GPL mentre dall'altro potrebbero essere sovrastimate se si considera come cut-off il 99° percentile. I pazienti, invece, con duplice o triplice positività presentano normalmente un valore di aCL IgG molto più alto rispetto ai pazienti con singola positività pertanto rientrano nel gruppo di sindromi anche se si considera solo come valore di cut-off il valore > 40 unità GPL.

CONCLUSIONI

Dal punto di vista clinico molti dei pazienti con il solo impegno ostetrico non erano più positivi quando si considerava come valore di cut-off il valore > 40 unità GPL, mentre i pazienti con il solo impegno vascolare o con entrambe le caratteristiche cliniche continuavano a essere positivi indipendentemente dal valore di cut-off considerato.

Attualmente è impossibile capire perché i pazienti APS con solo impegno ostetrico hanno valori medi anticorpali più bassi rispetto a quelli con trombosi. Sulla base della letteratura disponibile [17,18] possiamo ipotizzare che il meccanismo di azione nel danno placentare [19,20] è differente da quello che sviluppa la trombosi [21]. Sulla base delle nostre osservazioni è chiaro che il numero e il tipo di pazienti con APS varia in base al tipo di cut-off considerato, il quale deve essere sempre ben specificato quando viene intrapreso un trial clinico. Infine, la migliore soluzione sembra essere quella di utilizzare differenti valori di cut-off in base alle caratteristiche cliniche dei pazienti in quanto è stata trovata un'associazione tra la trombosi vascolare e valori > 40 unità GPL e tra l'impegno ostetrico e livelli < 40 unità GPL.

BIBLIOGRAFIA

1. Ruffatti A, Olivieri S, Tonello M *et al.* The effect of different IgG anticardiolipin antibody cut-off values on antiphospholipid syndrome classification. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1693-6.

2. Alarcon Segovia D, Sanchez-Guerriero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1989; 16: 482-88.

3. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. Report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-11.

4. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.

5. Tonello M, Ruffatti A, Favaro M *et al.* Sensibility and specificity for pregnancy morbidity of anti-beta2-glycoprotein I antibodies in antiphospholipid syndrome. *Reumatismo* 2005; 57: 262-6.

6. Bobba RS, Johnson SR, Davis AM. A review of the Sapporo and Revised Sapporo Criteria for the Classification of antiphospholipid Syndrome. Where do the Revised Sapporo Criteria add Value? *J Rheumatol* 2007; 6:1113-9.

7. Pengo V, Ruffatti A. Laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Reumatismo* 2007; 59: 187-91.

8. Ruffatti A, Tonello M, Del Ross T *et al.* Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity . *Thromb Haemost* 2006; 96: 337-41.

9. Brandt JT, Triplett DA, Alving B *et al.* Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74:1185-90.
10. Tincani A, Allegri F, Balestrieri G *et al.* Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004; 114: 553-8.
11. Reber G, Tincani A, Sanmarco M *et al.* Proposal for the measurements of anti-beta2- glycoprotein I antibodies. Standardization Group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1860-2.
12. Pierangeli SS, Harris EN. Clinical laboratory testing for the antiphospholipid syndrome. *Clin Chim Acta* 2005; 357:17-33.
13. Brandt JT, Triplett DA, Alvin B *et al.* Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
14. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C *et al.* A two-step coagulation test to identify antibeta-glycoprotein I lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 702-7.
15. Pengo V, Biasiolo A, Rampazzo P *et al.* dRVVT is more sensitive than KCT or TTI for detecting Lupus Anticoagulant activity of antibeta2-glycoprotein I autoantibodies. *Thromb Haemost* 1999; 81: 256-8.
16. Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T *et al.* Beta 2-glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1453-61.
17. Mackworth-young CG. Antiphospholipid syndrome: multiple mechanisms. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 393-401.

18. Di Simone N, Meroni PL, D'Asta M *et al.* Pregnancies complicated with antiphospholipid syndrome: the pathogenic mechanism of antiphospholipid antibodies. A review of the literature. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1108: 505-14.
19. Girardi G, Berman J, Redecha P *et al.* Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2003; 112: 1644-54.
20. Shamonki JM, Salmon JE, Hyjek E *et al.* Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196:167.
21. Erkan D, Lockshin MD. What is antiphospholipid syndrome? *Curr Rheumatol Rep* 2004; 6: 451-7.

SIGNIFICATO CLINICO DEGLI ANTICORPI ANTI ACIDO LISOBISFOSFATIDICO NEI PAZIENTI CON SINDROME DA ANTIFOSFOLIPIDI PRIMARIA [in press su *Reumatismo*]

INTRODUZIONE

L'acido lisobisfosfatidico (LBPA) è un fosfolipide che risiede negli endosomi tardivi delle cellule. Recentemente alcuni autori hanno ipotizzato [1,2] un suo probabile ruolo come target antigenico della sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS). L'LBPA, infatti, è un isomero idrofobico del fosfatidilglicerolo che ha una struttura simile alla cardiolipina ed è localizzato in domini specifici delle membrane interne degli endosomi tardivi (figura 1). Quest'ultimi sono organelli intracellulari multivescicolari ricchi di esteri del colesterolo e di un subset di fosfolipidi, coinvolti nei differenti steps del meccanismo di immagazzinamento e smistamento proteico (figura 2). E' stato inoltre evidenziato che gli anticorpi contenuti nei sieri di pazienti affetti da APS si legano all'LBPA contenuto negli endosomi tardivi e causano una ridistribuzione di diverse molecole tra cui la β_2 -GPI, proteina coinvolta nella patogenesi dell'APS [3].

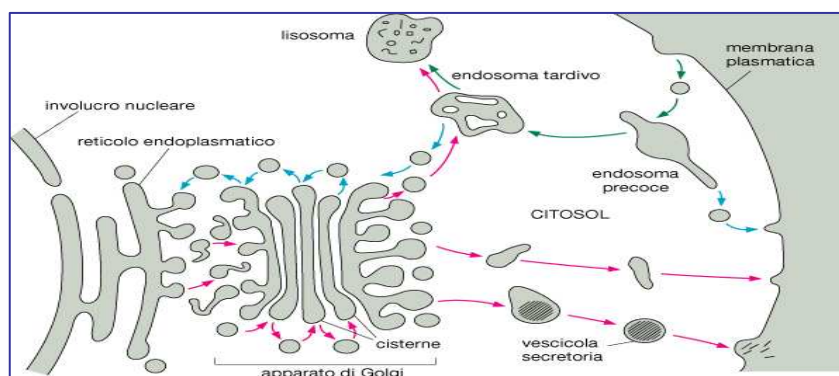


Figura 1. Late endosome nel meccanismo cellulare.

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare attraverso un test ELISA "home made" se gli anticorpi dei pazienti affetti da APS primaria si legavano all'LBPA e se avevano un valore clinico diagnostico. E' stata anche confrontata l'associazione tra il legame con l'LBPA e quello con la cardiolipina (CL), la β_2 -GPI e il lupus anticoagulant (LA) sia nell'ambito dell'APS che dei suoi diversi subsets clinici e di laboratorio.

PAZIENTI E METODI

Casistica

Sono stati studiati 140 pazienti affetti da APS primaria diagnosticata sulla base dei criteri di classificazione di Sidney [4] che comprendevano la trombosi vascolare in qualsiasi distretto corporeo, valutata clinicamente e confermata da esami strumentali e l'impegno ostetrico caratterizzato da (i) una o più morti fetali da causa sconosciuta prima della 10^a settimana di gestazione; e/o (ii) una o più nascite premature prima della 34^a settimana di gestazione di neonati morfologicamente normali, a causa di severa preclampsia o di segni di insufficienza placentare; e/o (iii) tre o più aborti spontanei consecutivi da causa sconosciuta prima della 10^a settimana di gestazione. I criteri di laboratorio includevano la presenza di almeno uno dei seguenti anticorpi: LA e/o anticorpi α - β_2 GPI di classe IgG/IgM e/o aCL di classe IgG/IgM a titolo medio/alto.

La casistica è stata poi suddivisa sulla base delle caratteristiche cliniche dell'APS, vale a dire la trombosi vascolare, l'impegno ostetrico ed entrambi gli impegni e sulla base delle seguenti categorie anticorpali: categoria I presenza di 2 o più aPL, categoria IIa presenza del solo LA, IIb presenza dei soli aCL e IIc presenza dei soli anti β_2 GPI.

Abbiamo testato la positività degli anticorpi anti-LBPA e di tutti gli aPL standard nei pazienti con APS e in 70 pazienti di controllo affetti da vari tipi di connettiviti sistemiche o da tiroidite autoimmune. Cento soggetti sani omogenei per sesso e per età con i pazienti affetti da APS sono stati testati al fine di calcolare i rispettivi cut-off.

Determinazione degli anticorpi anti-LBPA

Il legame degli anticorpi con l'LBPA è stato valutato usando un test ELISA "home-made". Le piastre Polysorp (Nunc, Roskilde, Denmark), dopo essere state seminate con una soluzione composta da 50 μ g/mL di LBPA sintetico (Avanti Polar Lipid, USA) in etanolo al 100%, e lasciate in frigorifero a 4°C per tutta la notte. Il bloccaggio è stato eseguito tramite incubazione per 2 h a temperatura ambiente con una soluzione composta da FCS/PBS al 10% (fetal calf serum/phosphate buffered saline). Dopo un primo lavaggio con 10% FCS/PBS le

piastre sono state seminate con i sieri dei pazienti diluiti 1:50 che sono stati lasciati incubare per 1 h. L'anticorpo di topo anti-LBPA (6C4, Echelon, Inc., USA) è stato utilizzato come standard per creare una curva di calibrazione. Dopo 3 lavaggi con 10% FCS/PBS le piastre sono state messe a incubare per 1.5 h con 100 µl di una soluzione composta da anticorpi antihuman IgG, antihuman IgM rispettivamente e antimouse IgG e IgM per la curva di calibrazione, coniugati a fosfatasi alcalina (Sigma, St Louis, Mo, USA). I pozzetti sono stati poi lavati e messi a incubare a 37° C con *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma). L'enzima, reagendo con questo substrato provoca una conversione colorimetrica proporzionale alla concentrazione dell'anticorpo presente, la quale viene rilevata dallo spettrofotometro come valore di assorbanza. I valori di assorbanza, ottenuti utilizzando un lettore per micropiastre (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) con filtro 405 nm, sono stati espressi in densità ottica (OD) e trasformati in unità arbitrarie confrontandoli con quelli di una curva di calibrazione costruita tramite diluizioni scalari dello standard noto. E' stato considerato come cut-off il 99° percentile dei valori ottenuti nei soggetti sani.

Determinazione degli aPL standard

I metodi di determinazione degli aCl IgG e IgM, degli anti- β_2 GPI IgG e IgM e del LA sono già stati riportati nel precedente lavoro a pag.49.

Analisi statistica

L'associazione degli anticorpi anti-LBPA di isotipo IgG e IgM con l'APS considerata globalmente e con i suoi subsets clinici ed anticorpali è stata analizzata con il test del χ^2 .

RISULTATI

I pazienti con APS primaria (19 uomini e 121 donne, età media 38 ± 12 DS) sono stati suddivisi in base alle caratteristiche cliniche e al profilo anticorpale. Vi erano 78 (55%) pazienti con trombosi vascolare, 50 (35.7%) con impegno ostetrico e 12 (8.5%) con entrambe le caratteristiche cliniche. In base al profilo anticorpale 16 (11%) pazienti appartenevano alla categoria I e 124 (89%) alla categoria II.

I pazienti di controllo affetti da altre malattie autoimmuni erano 70 (4 uomini e 66 donne, età media 37 ± 9 DS) rispettivamente affetti: 24 da connettiviti sistemiche e 46 da tiroidite autoimmune.

I sieri di tutti i pazienti affetti da APS primaria e dei controlli sono stati testati per la presenza di anticorpi anti-LBPA e per confronto degli aCL, degli anti- β_2 GPI e del LA.

L'anticorpo anti-LBPA IgG era presente nel 58,6 % dei pazienti affetti da APS e nel 7,1 % dei pazienti di controllo. La positività per l'anticorpo anti-LBPA di classe IgM era pari al 28,6 % nei soggetti con APS e al 2,9 % nei controlli. Il test per l'associazione dell'anti-LBPA IgG con il gruppo APS è risultato significativo ($p=0,000$) con una sensibilità pari a 58,6 % e una specificità pari al 92,9%. Il test per l'associazione dell'anti-LBPA IgM con il gruppo APS è risultato anch'esso significativo ($p=0,000$) anche se con una sensibilità minore pari al 28,6%, ma una specificità molto elevata pari al 97,1%. Gli aCL IgG sono stati ritrovati nel 69,3 % dei pazienti con APS e nell'11,4 % dei controlli; mentre gli aCL IgM nel 42,1 % dei pazienti con APS e nel 1,4 % dei controlli. Gli anti- β_2 GPI IgG erano presenti nell'80,7 % delle APS e nel 4,3 % dei controlli, mentre gli anti- β_2 GPI IgM nel 39,3 % delle APS e nel 7,1 % dei controlli. L'attività LA era positiva nel 52,7 % delle APS e nel 5,7 % dei controlli.

In tabella I sono riportati i valori (%) della sensibilità e specificità per l'APS degli anticorpi anti-LBPA IgG e IgM assieme a quelli degli altri aPL convenzionali.

Tabella I. Sensibilità e specificità per l'APS degli anticorpi anti-LBPA, aCL, anti- β_2 GPI e LA.

Anticorpi	Sensibilità per APS (%)	Specificità per APS (%)
Anti-LBPA IgG-	58,6	92,9
aCL IgG	69,3	88,6
Anti-LBPA IgM-	28,6	97,1
aCL IgM	42,1	98,6
Anti-LBPA IgG-	58,6	92,9
anti- β_2 GPI IgG	80,7	95,7
Anti-LBPA IgM-	28,6	97,1
anti- β_2 GPI IgM	39,3	92,9
Anti-LBPA IgG e/o IgM	72,8	88,6
LA	52,8	94,3

La sensibilità degli anti-LBPA è risultata minore rispetto a quella di tutti gli altri aPL e in particolare rispetto alla β_2 GPI di classe IgG. Gli anti-LBPA hanno presentato, invece, una maggiore sensibilità rispetto al LA. Tutti gli aPL hanno mostrato un valore di specificità elevata e simile tra di loro ad eccezione del LA il quale ha rivelato una specificità leggermente inferiore.

I pazienti affetti da APS sono stati suddivisi in base alle caratteristiche cliniche in pazienti con trombosi, con impegno ostetrico e con entrambe le caratteristiche. Nella tabella II sono riportate le frequenze degli anticorpi anti-LBPA, aCL, anti- β_2 GPI e LA di ogni sottogruppo clinico.

Tabella II: Frequenza (%) degli anticorpi anti-LBPA, aCL, anti- β_2 GPI e LA nei pazienti con impegno ostetrico, con trombosi vascolare e con entrambi gli impegni dell'APS.

Anticorpi	Impegno ostetrico	Trombosi vascolare	Impegno ostetrico + Trombosi vascolare
LBPA IgG	28 %	72 %	100 %
aCL IgG	48 %	78 %	100 %
LBPA IgM	22 %	35 %	17 %
aCL IgM	32 %	50 %	33 %

LBPA IgG	28 %	72 %	100 %
β_2 -GPI IgG	66 %	87 %	100 %
LBPA IgM	22 %	35 %	17 %
β_2 -GPI IgM	32 %	45 %	33 %
LBPA IgG e/o IgM LA	48 % 26 %	84,6 % 67 %	100 % 83 %

La prevalenza degli anticorpi anti-LBPA nell'impegno ostetrico è risultata minore rispetto a quella di tutti gli altri aPL determinati con metodo ELISA e superiore solo a quella del LA. Anche nella trombosi vascolare la frequenza degli anticorpi anti-LBPA era inferiore a quella degli altri aPL ELISA e superiore a quella del LA. Invece, nei pazienti con entrambi gli impegni dell'APS la frequenza degli anticorpi anti-LBPA era uguale a quella degli aCL e degli anti- β_2 GPI di tipo IgG, mentre era inferiore a quella degli aCL e degli anti- β_2 GPI di tipo IgM e maggiore a quella del LA.

I valori medi ($\pm$ Deviazione Standard, DS) di aCL IgG e IgM nei pazienti con impegno ostetrico erano di 23,5 unità ($\pm$ 27,5 DS) e 38 unità ($\pm$ 63,4 DS) rispettivamente; questi valori erano più bassi rispetto a quelli ritrovati nei pazienti con trombosi vascolare ($53,8 \pm 32,4$ DS e $76,7 \pm 172,3$ DS, rispettivamente) e a quelli riscontrati nei pazienti con entrambe le caratteristiche cliniche ($65 \pm 24,6$ DS e $50 \pm 103,5$ DS, rispettivamente). La stessa situazione valeva anche per i valori medi di anti- β_2 GPI IgG e IgM i quali erano più bassi nei pazienti con solo impegno ostetrico ($34,5 \pm 75,3$ DS e $12,8 \pm 20,3$ DS, rispettivamente), più alti nei pazienti con trombosi vascolare ($145,9 \pm 209,2$ DS e $22,9 \pm 39,8$ DS, rispettivamente) e ancora più elevati in quelli con entrambe le caratteristiche ($183,9 \pm 239$ DS e $16,5 \pm 25,7$ DS, rispettivamente).

Analogamente i valori anticorpali di anti-LBPA IgG e IgM nei pazienti con impegno ostetrico ($24 \pm 38,7$ DS e $22 \pm 27,3$ DS, rispettivamente) erano più bassi rispetto ai valori riscontrati nei pazienti con trombosi vascolari ($46,6 \pm 30,4$ DS e $31,8 \pm 41,3$ DS, rispettivamente) e a quelli evidenziati nei soggetti con entrambe le caratteristiche cliniche ($59,9 \pm 25,3$ DS e $21,8 \pm 24,6$ DS, rispettivamente).

Quando i pazienti con APS sono stati suddivisi in base al profilo anticorpale è stato osservato (tabella III) che a differenza di tutti gli altri aPL gli anticorpi anti-LBPA sia IgG che IgM non sono mai stati ritrovati presenti da soli nei pazienti con APS. Nella categoria I la prevalenza degli anticorpi anti-LBPA IgG/IgM era sempre minore a quella degli aCL IgG/IgM e degli anti- β_2 GPI IgG/IgM e superiore solo a quella del LA.

Tabella III: Frequenza (%) della positività per gli anticorpi anti-LBPA, aCL, anti- β_2 GPI e LA nel gruppo di pazienti con APS appartenenti alla categoria I e II.

Anticorpi	Categoria II	Categoria I
LBPA IgG	0	67 %
aCL IgG	12,5 %	77 %
LBPA IgM	0	31 %
aCL IgM	6 %	47 %
LBPA IgG	0	67 %
β_2 -GPI IgG	37,5 %	85 %
LBPA IgM	0	31 %
β_2 -GPI IgM	37,5 %	39,5 %
LBPA IgG e/o IgM	0	94,3 %
LA	12,5 %	56 %

DISCUSSIONE

Studi recenti hanno dimostrato che gli anticorpi di pazienti affetti da APS riconoscono un fosfolipide anionico (LBPA) presente negli endosomi tardivi di vari tipi di cellule in coltura [2]. In particolare hanno trovato un'associazione degli anticorpi anti-LBPA con gli aCL, gli anti- β_2 GPI ed il LA, anche se gli anti-LBPA mostravano una minore sensibilità per l'APS rispetto agli aCL. Alla conclusione di questo studio, tuttavia, gli autori ponevano dei dubbi sulla reale utilità clinica degli anticorpi anti-LBPA.

Il nostro lavoro ha mostrato l'associazione significativa dell'anti-LBPA IgG con l'APS con una sensibilità del 58,6 % e una specificità del 92,9% e parimenti l'associazione significativa con l'APS dell'anti-LBPA IgM con una sensibilità del 28,6% ed una specificità molto elevata del 97,1%, attribuendo così a questi anticorpi valore nella diagnosi di APS primaria.

Tuttavia la sensibilità per l'APS degli anticorpi anti-LBPA IgG e IgM testati con un metodo ELISA "home made" è risultata inferiore a quella degli altri aPL determinati sempre con metodo ELISA "home made". Tale sensibilità era solo superiore a quella del LA che era stato ricercato con metodi emocoagulativi, notoriamente meno sensibili. La specificità per APS dell'anti-LBPA è risultata molto elevata, tuttavia del tutto simile a quella degli altri aPL ELISA e logicamente inferiore a quella del LA. Tali risultati attribuiscono agli anti-LBPA un valore diagnostico certamente non superiore a quello degli altri aPL ELISA.

Nella parte successiva dello studio abbiamo confrontato la distribuzione degli anti-LBPA con quella degli altri aPL nei diversi impegni clinici dell'APS ed abbiamo osservato che nell'impegno ostetrico la sua prevalenza era sempre inferiore a quella di tutti gli altri aPL ELISA e superiore solo a quella del LA. Lo stesso comportamento è stato osservato nella trombosi; mentre nei pazienti con entrambe le caratteristiche cliniche era presente una prevalenza di anti-LBPA simile o inferiore a quella degli altri aPL ELISA e solo superiore a quella del LA. Pertanto anche in questo caso risulta impossibile attribuire agli anti-LBPA un valore clinico maggiore degli altri aPL ELISA nelle diverse forme cliniche dell'APS.

Il comportamento dei livelli anticorpali medi degli anti-LBPA è risultato analogo a quello degli altri aPL ELISA; infatti, in accordo con un nostro lavoro precedente [10], i livelli erano bassi nell'impegno ostetrico, intermedi nella trombosi ed elevati nei pazienti con entrambe le caratteristiche cliniche.

Quando abbiamo esaminato il profilo anticorpale abbiamo notato che gli anticorpi anti-LBPA sia IgG che IgM non erano mai presenti da soli nei pazienti con APS, mentre tutti gli altri aPL avevano una frequenza di positività isolata variabile tra il 6 ed il 37,5 %. Nella categoria I la prevalenza degli anticorpi anti-LBPA era sempre minore a quella degli anticorpi aCL e anti- β_2 GPI e superiore solo a quella del LA.

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo concludere che nella pratica clinica la determinazione degli anticorpi anti-LBPA non risulta un reale vantaggio sia nella diagnosi di APS che nella distinzione dei diversi subsets clinici e di laboratorio. Infatti, tali anticorpi, pur risultando altamente specifici per la APS, mostrano sempre una minore sensibilità degli aCL e degli anti- β_2 GPI. Nei confronti del LA gli anti-LBPA pur dimostrando una maggiore sensibilità, sicuramente attribuibile al diverso metodo di determinazione, non possono essere considerati di maggiore valore clinico a causa della minore specificità diagnostica.

Questi dati, un po' deludenti, sicuramente necessitano di ulteriori verifiche prima che tali anticorpi siano definitivamente eliminati dalla diagnostica dell'APS. Gli anti-LBPA, infatti, risultano attualmente di grande interesse biologico per la loro interferenza nella distribuzione e nell'accumulo della β_2 GPI all'interno delle strutture reminescenti vescicolari perinucleari degli endosomi tardivi [3] e per la capacità di allungare in vitro i tests della coagulazione fosfolipide-dipendenti.

BIBIOGRAFIA

1. Alessandri C, Bombardieri M, Di Prospero L *et al.* Anti-lysobisphosphatidic acid antibodies in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 173-80.
2. Sorice M, Ferro D, Misasi R *et al.* Evidence for anticoagulant activity and β_2 -GPI accumulation in late endosomes of endothelial cells induced by anti-LBPA antibodies. *Thromb Haemost* 2002; 87: 735-41.
3. Galve-de-Rochemonteix B, Lobayashi T, Rosnoblet C *et al.* Interaction of antiphospholipid antibodies with late endosomes of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 563-74.
4. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi M *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306
5. Tincani A, Allegri F, Balestrieri G *et al.* Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004; 114: 553-8.
6. Pierangeli SS, Harris EN. Clinical laboratory testing for the antiphospholipid syndrome. *Clin Chim Acta* 2005; 357: 17-33.
7. Reber G, Tincani A, Sanmarco M *et al.* Proposal for the measurement of anti-b2-Glycoprotein I antibodies. Standardization Group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1860-2.
8. Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T *et al.* Beta 2-Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1453-61.

9. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M *et al.* Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian Registry. *Am J Med* 1996; 100: 530–6.
10. Ruffatti A, Olivieri S, Tonello M *et al.* Influence of different IgG anticardiolipin antibody cut-off values on antiphospholipid syndrome classification. *J Thromb Haemost* 2008; 6(10): 1693-6.