# Caleidoscop



**Direttore Responsabile** Sergio Rassu

Tariffa R.O.C.: "Poste Italiane S.p.a. - Sped. in A.P.-D.I. 355203, (conv. in L. 27022004 n. 46) art 1 comma 1, DCB Genova". pº 194- Ontobre 2005. Dir resp.: Sergio Rassu - Editore: Nedical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: La Stampa S.p.A. - Genova

il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

## Caleidoscopio



Raffaella Faricelli, Sabina Esposito, Stefano Martinotti

U.O. di Patologia Clinica - Settore Autoimmunità e Immunologia Clinica Ospedale Clinicizzato "SS.Annunziata" - ASL Chieti

### La sindrome da anticorpi anti fosfolipidi

il ruolo degli anticorpi anti fosfolipidi e degli anti cofattori

Direttore Responsabile **Sergio Rassu** 

194

... il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

### ISTRUZIONI PER GLI AUTORI



INFORMAZIONI GENERALI. Caleidoscopio pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattilo scritte ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. Apreliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. Tabelle e figure. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e del l'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

Unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

Presentazione dell'amonografia. Riporre il dattiloscritto, le fotografie, una copia del testo in formato .doc oppure .rtf, ed copia di grafici e figure in formato Tiff con una risoluzione di almeno 240 dpi, archiviati su CD in buste separate.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista Caleidoscopio rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed accon sentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

 $Tutta\ la\ corrispondenza\ deve\ essere\ indirizzata\ al\ seguente\ indirizzo:$ 

Restless Architect of Human Possibilities sas Via Pietro Nenni, 6 07100 Sassari

### Caleidoscopio

### **Editoriale**

Il ricco curriculum degli Autori, ed in particolare del caposcuola, il Prof. Stefano Martinotti, non ci lascia spazio per la presentazione di questa monografia, che va a colmare un vuoto legato anche alla relativa novità del tema trattato. Rimane solo una riga per annotare la soddisfazione del "rientro" in Italia di una delle tante risorse andate a lavorare all'estero.

Il Prof. Stefano Martinotti, dopo l'iscrizione al Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia presso l'Università degli Studi di Roma "La Sapienza", frequenta in qualità di "summer student" il laboratorio del Tumor Cell Biology diretto dal Dr. Robert Gallo presso i National Institutes of Health (NIH) a Bethesda e successivamente vince una borsa di studio nell'ambito del programma di scambi culturali Italia-USA in qualità di "guest worker" presso il laboratorio del Dr. Gallo all'NIH. Dopo aver conseguito la Laurea in Medicina e Chirurgia vince una Borsa di studio (long-term fellowship) finanziata dalla EMBO (European Molecular Biology Organization) e lavora in qualità di "post-doctoral fellow" presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Yale, Connecticut USA, nel Laboratorio del Dr. Adrian Hayday. Ottiene una riestenzione della Borsa EMBO per un secondo anno, mentre viene finanziato per il terzo anno di attività con un "grant" dal Dipartimento di Biologia di Yale. Rientrato in Italia lavora presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale diretto dal Prof. Luigi Frati. Lavora per un breve periodo nel laboratorio del Dr. Hayday all'Università di Yale sulla clonazione del locus genomico del gene umano dell'adesione intercellulare (ICAM I) e coordina un gruppo di Ricerca attualmente impegnato nello studio della regolazione trascrizionale del gene ICAM-1. Vincitore di Concorso per Professore Universitario di seconda fascia nel raggruppamento di Patologia Generale e Clinica (F040) prende servizio presso l'Università degli Studi di L'Aquila.

Usufruendo del congedo per Anno Sabbatico dall'Università dell'Aquila è affiliato in qualità di Visiting Associate Professor presso la Columbia University, New York, USA nel laboratorio del Dr. Riccardo Dalla Favera dove si occupa della clonazione di alcuni geni coinvolti nella patogenesi della leucemia linfatica cronica (CLL). Viene quindi inquadrato nel ruolo di Dirigente di II livello nella erigenda Unità operativa di Patologia Molecolare

e Clinica presso la ASL 4. Quindi viene chiamato come Professore Straordinario di Patologia Clinica presso l'Università di Chieti – D'Annunzio e successivamente viene inquadrato come Direttore dell'Unità Operativa di Patologia Clinica II presso l'Ospedale Clinicizzato SS Annunziata – AUSL Chieti – UDA ed è chiamato a ricoprire il ruolo di Coordinatore dei Laboratori di Analisi dei Presidi Ospedalieri San Camillo/SS Annunziata – AUSL Chieti-Ortona.

La dr.ssa Faricelli Raffaella ha conseguito la laurea in Biologia presso l'Università degli studi de L'Aquila. Ha quindi frequentato il reparto di laboratorio analisi dell'ospedale SS. Annunziata di Chieti per assumere successivamente l'incarico di assistente biologo di ruolo presso la U.L.SS 04 di Chieti. Attualmente è biologo dirigente di I° livello presso la A.S.L. di Chieti.

Durante questi anni di attività presso il laboratorio analisi del Presidio Ospedaliero "SS.Annunziata" si è occupata di diversi settori: Immunologia, Autoimmunità, Allergologia, Microbiologia portandoli avanti come unica responsabile con l'aiuto di personale tecnico strutturato e di personale tecnico e biologo tirocinante. Ha quindi conseguito la laurea in Medicina e chirurgia presso l'università di Chieti e la specializzazione in Patologia Clinica.

Docente del Corso di Laurea in Tecnico di Laboratorio Biomedico Università G. D'Annunzio Facoltà di Medicina e Chirurgia, è responsabile del settore di Autoimmunità e Immunologia Clinica presso il reparto di Patologia Clinica della ASL di Chieti. E' stata relatrice in congressi scientifici, ha frequentato corsi di aggiornamento, è stata co-autrice di pubblicazioni scientifiche ed è stata presente in numerosi congressi scientifici.

La dr.ssa Sabina Esposito ha conseguito la laurea di I livello in Tecniche sanitarie di Laboratorio Biomedico presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi: "G. D'Annunzio" Chieti-Pescara discutendo la propria tesi sperimentale di laurea proprio sulla Sindrome degli anticorpi anti-fosfolipidi. Ha quindi svolto una serie di Tirocini professionalizzanti durante il corso degli studi presso i laboratori universitari di fisica, chimica, farmacologia, genetica ed i laboratori ospedalieri di patologia clinica, anatomia ed istologia patologica, microbiologia, virologia, immunoematologia. Ha svolto quindi l'internato di laurea presso il laboratorio di autoimmunità - Patologia clinica II - Ospedale SS. Annunziata - Chieti e fatto parte del Comitato Scientifico nell'evento formativo "La Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi e Cofattori" tenutosi a Chieti. Autore di numerose pubblicazioni su questo tema, attualmente collabora con dr.ssa Faricelli presso il laboratorio di autoimmunità - Patologia clinica II - Ospedale SS. Annunziata - Chieti.

### Sergio Rassu

### Introduzione

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è una condizione clinica caratterizzata dall'associazione di:

- o trombosi venose e, più raramente, arteriose;
- o perdita fetale ricorrente (aborti)
- o piastrinopenia (quantità ridotta di piastrine nel sangue).

Queste condizioni riconoscono, come base patogenetica, la formazione di un gruppo di autoanticorpi diretti contro i fosfolipidi delle membrane cellulari.

Gli eventi trombotici sono riportati in circa il 30% dei pazienti con anticorpi antifosfolipidi: trombosi venose profonde delle gambe e/o embolismo polmonare cosituiscono approssimativamente 2/3 degli eventi trombotici, e le trombosi arteriose e cerebrali le più frequenti complicazioni.

Le più comuni manifestazioni ostetriche includono fallimenti spontanei e ricorrenti, morti fetali o crescita ritardata. Donne con anticorpi antifosfolipidi sono particolarmente inclini nel secondo trimestre, o inizio del terzo trimestre di gravidanza, ad avere morte fetale.

Un grado variabile di trombocitopenia è riportato nel 20%-25% circa dei pazienti. La trombocitopenia è generalmente mite e raramente si associa a complicazioni: solamente il 5%-10% dei pazienti è severamente trombocitopenico (numero di piastrine inferiore a  $150.000/\mathrm{mm}^3$ ).

### APS: forme primarie e secondarie

La Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi si può manifestare in assenza di altre patologie ed in questo caso viene definita primitiva.

Spesso però si associa ad altre patologie di tipo autoimmunitario come il Lupus Eritematoso Sistemico, a patologie simili al LES (Lupus-like disease) per le quali non sono presenti criteri sufficienti per la classificazione del LES e ad altre patologie autoimmuni non meglio precisate.

Talvolta la sindrome si manifesta in soggetti affetti da neoplasie o dopo l'assunzione di alcuni farmaci come ad esempio la cloropromazina.

Gli anticorpi antifosfolipidi possono essere presenti (di solito temporaneamente) anche in corso di infezioni senza però le tipiche manifestazioni cliniche della sindrome.

Lo studio più recente coordinato da R. Cervera<sup>(1)</sup> per l'European aPL Forum su una casistica di 1000 pazienti, ha delineato la modalità di presentazione della patologia nei soggetti colpiti (tabella 1).

Patologia	N°	%
APS primaria	531	53
LES	370	37
Lupus-like	47	4
Sindrome di Sjogren	23	2
Artrite Reumatoide	20	2
Sclerodermia	8	1
Vasculiti sistemiche	7	1
Dermatomiosite	2	0.2

Tabella 1. Modalità di presentazione della APS.

I pazienti con APS rappresentano dunque un gruppo eterogeneo che costituisce modalità diverse di presentazione di una stessa malattia piuttosto che entità cliniche diverse (tabella 2).

Il quadro clinico di presentazione della APS nelle forme primitive è sostanzialmente sovrapponibile a quello che si osserva in corso di LES o di altra malattia autoimmune sistemica.

- 1 Pazienti con APS ma senza una malattia autoimmune sistemica diagnosticabile (Primary APS)
- 2 APS associata ad una malattia autoimmune sistemica, prevalentemente LES (Secondary APS)
- Pazienti con APS e con "lupus-like disease", che in altre parole manifestano segni di interessamento sistemico e per i quali non è formalmente possibile soddisfare i criteri di classificazione per il LES
- Presenza di aPL legati ad altre cause, quali farmaci, neoplasie, processi infettivi. La maggior parte di questi pazienti non presenta le manifestazioni
  tipiche della sindrome ma solo un titolo elevato di aPL. In taluni report è
  stata anche descritta la comparsa di manifestazioni cliniche (solitamente
  trombosi), ma questi casi sembrano rappresentare più l'eccezione che non la
  regola.

Tabella 2. Spettro delle presentazioni cliniche della APS.

Sono tuttavia riscontrabili alcune differenze che appaiono, per la maggior parte, imputabili all'esistenza di fondo delle forme secondarie. Questo vale soprattutto per la maggiore prevalenza di artriti franche, osteonecrosi, interessamento renale, valvulopatie cardiache, anemia emolitica e di leucopenia. Infatti queste manifestazioni fanno parte del contesto clinico del LES, che è la patologia prevalentemente associata alla APS.

Il rapporto maschi/femmine indica che la patologia nella sua forma primaria interessa decisamente in misura maggiore il sesso femminile (3,5:1) e tende ad aumentare nella APS associata al LES (7:1).

Sovrapponibili sono, inoltre, le caratteristiche delle principali manifestazioni cliniche nelle due forme: la trombosi e la abortività.

### Manifestazioni cliniche

Gli anticorpi antifosfolipidi sono stati riscontrati in due categorie di pazienti: nel primo gruppo di soggetti sono frequenti le manifestazioni trombotiche, la piastrinopenia e gli aborti mentre nel secondo gruppo questi anticorpi sono responsabili di scarse manifestazioni cliniche (tabella 3). Gli anticorpi trovati in pazienti con malattia tromboembolica tendono ad essere a più alto titolo, persistenti e con isotipo IgG o IgA. Al contrario, gli anticorpi antifosfolipidi non patologici sono frequentemente a basso titolo, transitori e più spesso IgM.

Tipo delle manifestazioni	PAPS %	APS associata al LES
Artrite	4	62
Livedo reticularis	17	35
Tromboflebiti superficiali	8	17
Epilessia	4	9
Necrosi cutanea superficiale	1	4
Lesioni cutanee pseudo-vasculitiche	2	6
Osteonecrosi	1	4
Miocardiopatia cronica	1	4
Trombosi glomerulare	21	38
Anemia emolitica	5	16
Leucopenia	3	36
Stroke	22	16
Trombosi arti superiori	2	0.4
Valvulopatia cardiaca	37	63

Tabella 3. prevalenza delle diverse manifestazioni cliniche in corso di APS primaria (PAPS) e di APS secondaria a LES.

• Gli <u>eventi tromboembolici</u> caratterizzano tipicamente la sindrome e possono verificarsi praticamente in qualsiasi distretto vascolare.

Sono più frequenti nel distretto venoso (2/3 circa dei casi contro 1/3 di quello arterioso) dove si possono verificare trombosi venose profonde agli arti inferiori o superiori, embolia polmonare ed eventuale ipertensione polmonare cronica secondaria, trombosi della vena centrale della retina o suoi rami. Più raramente si può verificare la trombosi venosa a livello delle ghiandole surrenali con loro distruzione su base emorragica e conseguente iposurrenalismo, l'occlusione trombotica con sindrome di Budd-Chiari e l'occlusione dei seni venosi cerebrali.

E' interessante notare come un ampio studio condotto su casi autoptici<sup>(2)</sup> abbia dimostrato come l'APS sia comunemente associata ad eventi tromboembolici che non si accompagnano a quadri di vasculite. La lesione dominante è infatti rappresentata da una microangiopatia trombotica senza infiltrati perivascolari.

Le trombosi tendono a recidivare, tipicamente nello stesso distretto del primo evento, pertanto richiedono una attenta valutazione prognostica e terapeutica.

• La sede più comune delle <u>occlusioni arteriose</u> è l'ambito cerebrale. Si possono clinicamente manifestare ischemie transitorie (TIA) oppure persistenti (figura 1).

Talvolta, ripetuti episodi ischemici anche asintomatici, possono portare a quadri di demenza. In alcuni casi l'ischemia cerebrale si può manifestare come epilessia (3). Spesso i pazienti con ischemia presentano episodi di emicrania.

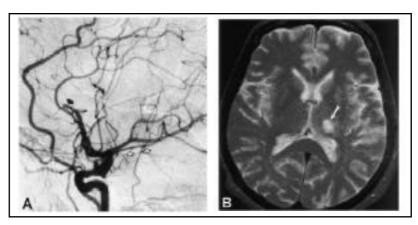


Figura 1. Donna di 56 anni con attacchi ischemici transitori (TIA) trattati con terapia immunosoppressiva.

A, angiogramma dell'arteria carotidea, vista laterale di occlusione arterio - sa (freccia scura) ed intervalli alternati di dilatazione e restringendo (frecce chiare).

- B, visione del lato sx di un infarto talamico (indicato dalla freccia).
- L'APS rappresenta una delle più frequenti cause di trombofilia responsabili di STROKE e TIA, d'altra parte <u>l'infarto cerebrale focale</u> è la manifestazione più comune della trombosi arteriosa in corso di Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi.

• La <u>Livedo reticularis</u> (LR) (figura 2) è una manifestazione clinica che appare sulla cute come un evidente reticolo di colore rosso vino dovuto all'occlusione dei vasi cutanei e che può localizzarsi sia alle estremità che al tronco.



Figura 2. Livedo reticularis.

Essa è dovuta ad un ristagno di sangue nei capillari superficiali e nelle venule, che ne risultano dilatati. La LR è stata osservata in corso di connettiviti e successivamente correlata alla presenza di anticorpi aPL.

• L'associazione di ischemia cerebrale e livedo reticularis caratterizza la <u>sindrome di Sneddon</u>, dal nome del dermatologo inglese che per primo la descrisse.

Già nel 1965 Sneddon aveva ipotizzato un'associazione tra LR ed arteriopatia descrivendo una serie di casi clinici in cui la sintomatologia cutanea si associava a gravi disturbi neurologici su base ischemica. E' stato successivamente ipotizzato che la Sindrome di Sneddon rappresentasse un aspetto dell'APS, ma la relativamente frequente osservazione di casi negativi per aPL circolanti induce piuttosto a ritenere che essa possa essere associata anche ad altre e più complesse coagulopatie.

- L'APS può essere associata anche ad altre <u>manifestazioni dermatologi-</u> <u>che</u> quali ulcere cutanee (specie agli arti inferiori) e noduli sottocutanei.
- I molteplici aspetti delle <u>manifestazioni neurologiche</u> osservabili in corso di APS rendono conto del polimorfismo di questa entità sindromica riconducibile comunque verosimilmente ad un unico, ma ancora sconosciuto, meccanismo patogenetico.
- Altra comune manifestazione clinica è la <u>malattia valvolare cardiaca</u>. Vegetazioni formate da fibrina e piastrine compaiono frequentemente sulla valvola mitrale e su quella aortica in pazienti con APS.

Studi mediante ecocardiografia transtoracica hanno documentato vegetazioni in approssimativamente il 37% dei pazienti con Lupus Eryhtematosus Sistemico che presentavano positività per gli anticorpi antifosfolipidi nei tests di laboratorio.

• La <u>patologia ostetrica</u> associata ad aPLriguarda aborti spontanei e ricorrenti, perdite fetali, ritardi di crescita fetale etc. <sup>(4)</sup>.

Le perdite fetali sono il sintomo più frequente che conduce allo studio e all'inquadramento delle pazienti. Infatti, come specificato nella tabella dei criteri di classificazione, un "peso" diverso viene assegnato alle morti fetali (avvenute quindi dopo le prime 10 settimane di gestazione), rispetto agli aborti precoci. Più significative rispetto alla diagnosi sono considerate infatti le morti endouterine fetali, di cui è sufficiente un solo episodio come criterio di diagnosi di APS.

Anche la preeclampsia ed il ritardo di crescita, considerati criterio classificativo, rientrano nei problemi del II e III trimestre, per cui la Sindrome da Antifosfolipidi nel suo insieme pare essere più frequentemente un problema dello sviluppo fetale e, meno frequentemente, un problema di impianto dell'embrione.

La preeclampsia è una sindrome da ipertensione indotta dalla gravidanza, asociata a proteinuria, edema, anomalie della coagulazione, vari gradi di coagulazione intravascolare disseminata, spesso a disturbi di altri apparati.

La proteinuria è definita dalla presenza di 300 mg di proteine nelle 24 ore (è variabile ed è un sintomo tardivo) mentre l'edema è considerato patologico solo se generalizzato o se interessa le mani, il volto e le gambe. L'edema può presentarsi in una forma lieve ma può assumere una forma grave comprendente la sindrome HELLP (H=anemia emolitica microangiopatica, EL=enzimi epatici elevati, LP=bassa conta piastrinica).

L'eclampsia è una grave forma di preeclampsia con convulsioni o coma. Solitamente le convulsioni sono precedute da cefalea, dolore epigastrico, iperpiressia, emoconcentrazione. Può presentarsi prima del travaglio nel 50% dei casi, durante il travaglio nel 25%, nel puerperio iniziale nel 25% dei casi. Le pazienti con eclampsia vanno incontro ad una CID con lesioni epatiche, renali, cardiache, placentari ed encefaliche.

Patogenesi: preeclampsia eclampsia tossiemia gravidica.

I tre fattori che sembrano determinanti nella patogenesi di questa patologia sono: l'ischemia placentare, l'ipertensione e la CID.

Le cause scatenanti l'eclampsia sono sconosciute ma ci sono dati che sottolinenano l'importanza delle anomalie placentari. Queste consistono in un'anomala invasione del trofoblasto con sviluppo di modificazioni nei vasi placentari, necessari per mantenere una buona perfusione fetale. L'origine di tali anomalie è dovuta a fattori genetici, immunitari e ad altri fattori acquisiti. L'effetto finale è un'inadeguato impianto placentare con letto vascolare inefficiente al mantenimento della gravidanza.

La perfusione anomala che ne deriva determina un'ischemia placentare che costituisce la base organica per lo sviluppo dell'eclampsia. Si ritiene che la ridotta perfusione utero-placentrare induca la produzione di vasocostrittori ( trombossano, angiotensina, renina, endotelina) e inibisca quella dei vasodila tatori ( PGI2, PGE2, ossido nitrico) della placenta ischemica. Ne risultano ipertensione, CID ed altre alterazioni agli organi.

• L'associazione fra aPL e <u>aborti</u> del primo trimestre viene confermata anche da un recente studio condotto da Rai e coll. in cui viene analizzato l'esito gestazionale in 20 donne con positività agli anticorpi ed anamnesi di poliabortività che avevano rifiutato di ricevere un trattamento farmacologico nella loro successiva gravidanza. Dai risultati di questa indagine emerge come il 90% di queste donne vada incontro ad una perdita fetale e come la maggioranza degli aborti (94%) avvenga nel I° trimestre, portando gli autori a speculare su una possibile influenza negativa di questi anticorpi sui meccanismi di regolazione dell'impianto e della successiva placentazione (figura 3).

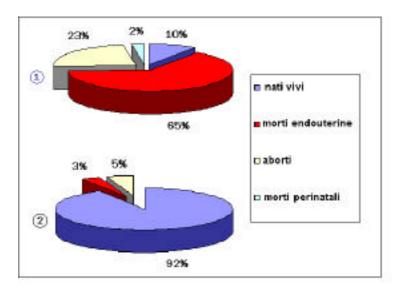


Figura 3. Esito della gravidanza prima 1 e dopo 2 la diagnosi di APS (ed il conseguente follow-up).

La patologia ostetrica associata ad APL può avere, almeno in parte, origine da fatti trombotici. In effetti, fatti trombotici a livello dei vasi placentari sono stati descritti frequentemente.

Verosimilmente tuttavia, altri meccanismi patogenetici, come una azione più diretta degli anticorpi antifosfolipidi sul trofoblasto, sembra possano essere implicati nel danneggiamento del feto, talvolta sproporzionato rispetto ai fenomeni trombotici rilevati a livello placentare.

Durante la formazione del sinciziotrofoblasto vi è una massiccia esposizione di fosfatidilserina ed etanolamina sulla superficie cellulare. Questi fosfolipidi permettono al citotrofoblasto di fondersi e formare una nuova struttura attorno al polo embrionale, il sinciziotrofoblasto, che pone a diretto contatto la circolazione fetale con il sangue materno (figura 4).

A causa della sua carica elettrica negativa, la fosfatidilserina lega la <sub>2</sub>GPI in quanto cationica, con la conseguente formazione di epitopi potenzialmente in grado di essere riconosciuti da anticorpi anti <sub>2</sub>GPI.

Questi anticorpi alterano le condizioni che permettono al citotrofoblasto (strato cellulare interno della blastocisti) di differenziarsi e quindi di approfondarsi nel sincizio per formare il sinciziotrofoblasto, impedendo l'impianto in decidua, inoltre, determinano modificazioni funzionali quali una ridotta secrezione di gonadotropina corionica.

Con lo stabilirsi delle connessioni tra i vasi dei villi trofoblastici e i vasi

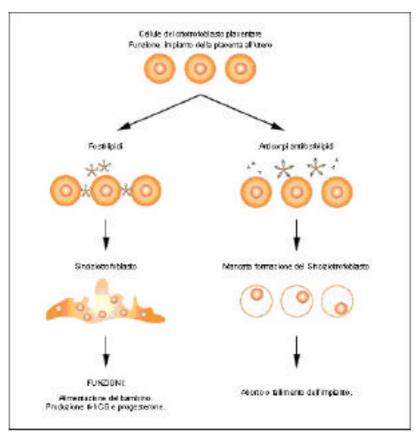


Figura 4. Azione degli anticorpi antifosfolipidi sulla formazione della pla -centa.

che sono sviluppati nel mesoderma embrionale, si attua il collegamento tra circolo embrionale e circolazione trofoblastica, indispensabile per l'alimentazione del feto.

Recentemente è stato focalizzato anche il ruolo dell'annessina V o placental anti-coagulant protein I (PAP-I) nel mantenimento dell'integrità della placenta. La annessina V, fortemente espressa sulla superficie apicale dei microvilli del sinciziotrofoblasto, è dotata di una potente attività anticoagulante in quanto ha la capacità di legare le superfici dei fosfolipidi a carica elettrica negativa, formando uno strato protettivo che impedisce l'avvio di reazioni coagulative.

Nelle pazienti con APS è stata riscontrata una diminuita quantità di annessina V a livello placentare, inoltre *in vitro* è stato dimostrato che gli aPL, probabilmente complessati con <sub>2</sub>GPI, riducono il livello di annessina V in cellule trofoblastiche in coltura.

Questa potrebbe essere una seconda via patogenetica di danno aPL-mediato della gravidanza, basata su fenomeni trombotici a livello delle strutture (trofoblasto e/o endotelio) che esprimono annessina V.

 $\bullet$  La <u>trombocitopenia</u> rappresenta una delle manifestazioni principali della APS ed in tutte le casistiche compare con una elevata prevalenza. Una trombocitopenia di grado moderato si osserva nel 40 % dei casi, mentre è severa in non più del 5-10 % dei casi (<150.000/mm³).

Nella maggior parte dei casi si tratta di una trombocitopenia periferica dovuta a degli autoanticorpi anti-glicoproteine piastriniche (soprattutto anti-IIb-IIIa). Altri meccanismi sono possibili come illustrano alcune rare osservazioni di microangiopatie caratterizzate dal consumo delle piastrine coinvolte nella formazione di microtrombi periferici multipli. Più raramente, può essere considerata conseguenza di un ipersplenismo, di una ipertensione portale secondaria a trombosi epatiche. L'anemia emolitica sembra estremamente rara nella forma primaria di APS, ma più frequentemente si trova nella forma associata al lupus.

• La <u>sindrome catastrofica</u> degli antifosfolipidi è una patologia descritta recentemente che si caratterizza per una serie di problemi multiviscerali dovuti a microtrombi multifocali. La diagnostica è difficile a causa della moltitudine di manifestazioni cliniche (microangiopatie trombotiche, coagulazione intravascolare disseminata, embolia, porpora trombotica trombocitopenica indotta dall'eparina...) che necessitano di una diagnostica differenziale. La conoscenza di questa diagnostica eccezionale è imperativa, poiché essa induce ad un approccio terapeutico urgente (plasmaferesi). Malgrado ciò, la mortalità è di circa il 50%.

### Aspetti eziopatogenetici

La patogenesi delle manifestazioni cliniche nella sindrome da anticorpi antifosfolipidi è multifattoriale. La trombogenesi, in particolare, coinvolge le cellule endoteliali e le piastrine, ma anche i monociti possono svolgere un'azione procoagulante:

<u>cellule endoteliali</u> → danno endoteliale diretto; diminuzione della produzione di prostaciclina; diminuzione del rilascio di t-PA; diminuzione dell'attività della trombomodulina; esposizione di TF.

<u>piastrine</u> → attivazione diretta per interazione con i fosfolipidi di membrana.

Tutti questi effetti determinano uno spostamento della "bilancia" endoteliale verso l'attività protrombogena.

### Le cellule endoteliali

La conversione ad un fenotipo protrombotico delle cellule endoteliali è stata suggerita quale causa dello stato di ipercoagulabilità dell'APS. L'attivazione endoteliale in vivo è stata recentemente supportata dalla presenza di aumentati livelli di proteine e microparticelle di derivazione endoteliale nel plasma di pazienti con APS.

Attualmente è accettato che gli aPL possono reagire con le cellule endoteliali, principalmente attraverso il legame con la 2GPI espressa sulla membrana delle cellule endoteliali. La 2GPI esogena può legarsi alle cellule endoteliali nel sito di attacco dei fosfolipidi, situato nel quinto dominio della molecola oppure attraverso l'annessina II, un recettore delle cellule endoteliali per l'attivatore tissutale del plasminogeno.

Gli anticorpi anti- <sub>2</sub>GPI riconoscono la <sub>2</sub>GPI della membrana cellulare endoteliale sia in cellule endoteliali derivate dal microcircolo sia in quelle derivate del macrocircolo.

Gli anticorpi antifosfolipidi inducono un fenotipo proadesivo e proinfiammatorio.

E' stato dimostrato che le frazioni IgG intere o le IgG anti- 2GPI purificate per affinità da sieri positivi per aPL 2GPI-dipendenti, oppure anticorpi monoclonali umani anti- 2GPI sono in grado di indurre un fenotipo endoteliale proadesivo, attraverso la up-regolation di molecole di adesione (E-selectina, intercellular adhesion molecule-1 [ICAM-1], vascular cell adhesion molecule-1 [VCAM-1]) e un'aumentata sintesi e secrezione di citochine proinfiammatorie (interleuchina-1 e interleuchina-6) in vitro.

L'attivazione endoteliale è associata ad uno stato pro-coagulatorio; inoltre le citochine proinfiammatorie e l'adesività inducono un fenotipo procoagulante anche nei leucociti mononucleati adesi. Recenti osservazioni suggeriscono che questo non sia un artefatto in vitro ma che possa avvenire anche in vivo.

Una up-regulation di marker dell'attivazione delle cellule endoteliali è stata riscontrata nella valvulopatia cardiaca associata ad APS. Inoltre livelli plasmatici significativamente alti di VCAM-1 solubile sono stati trovati in pazienti con sindrome da anticorpi antifosfolipidi primitiva (APS primaria) oppure secondaria a LES e che avevano trombosi severe ricorrenti. Questi livelli erano correlati negativamente con la conta piastrinica nella APS primaria. Ancora, topi cui erano stati iniettati passivamente aPL mostravano una maggiore formazione di trombi ed un incremento locale di adesione leucocitaria dopo trauma meccanico alla parete venosa in vivo. Questi effetti erano inibiti in topi deficienti per ICAM-1 o ICAM-1 e P-Selectin oppure in animali trattati con anticorpi bloccanti anti-VCAM1. Al contrario l'attivazione endoteliale non era ridotta in topi deficienti per FcR: questi ultimi dati sono in accordo con il fatto che il coinvolgimento del FcR non sembra essere necessario per l'attivazione endoteliale in vitro dal momento che quest'ultima può essere indotta anche con anticorpi umani monoclonali anti- 9GPI di classe IgM.

L'attivazione endoteliale indotta da anticorpi anti- <sub>2</sub>GPI è causata verosimilmente dal cross-link del cofattore complessato a strutture che fungono da recettore; questa aggregazione esita in un segnale per le cellule. Dal momento che l'annessina II non possiede una coda intracitoplasmatica, il suo coinvolgimento richiede probabilmente una proteina adapter sconosciuta. Alternativamente, è stato suggerito che l'annessina II possa interferire con i canali del calcio, o che siano coinvolte altre strutture della membrana cellulare in grado di innescare un segnale intracellulare.

L'attivazione endoteliale indotta dagli anticorpi anti- 2-glycoprotein I sembra giocare anche un ruolo nell'aterosclerosi accelerata associata con la APS. Dati recenti hanno mostrato che le statine – una famiglia di farmaci ipocolesterolemizzanti – sono in grado di inibire l'attivazione endoteliale da anti- <sub>2</sub>GPI in vitro, offrendo in tal modo nuove interessanti prospettive terapeutiche.

Gli anticorpi antifosfolipidi inducono un fenotipo procoagulante.

Il Tissue Factor, una proteina transmembranaria, è il principale innesco della coagulazione in vivo. E' espresso anche sulla membrana delle cellule endoteliali. Anticorpi umani monoclonali anti- 2GPI di classe IgM aumentano l'espressione di Tissue Factor mRNAnelle cellule endoteliali in vitro. Non è chiaro se gli anti- 2GPI inneschino la sintesi del Tissue Factor direttamente o se le citochine pro-infiammatorie indotte dagli stessi anticorpi giochino un ruolo indiretto.

E' stato suggerito che gli aPL possano spiazzare lo "scudo" fisiologico di annessina V che copre le strutture con carica elettrica negativa sulla superficie delle membrane endoteliali, determinando in tal modo un fenotipo procoagulante. Recentemente, uno studio ha dimostrato come questo effetto sia strettamente correlato alle concentrazioni di  $_2$ GPI e di anticorpi anti- $_2$ GPI. Willems et al. hanno tuttavia riportato dati contrastanti, dimostrando che complessi aPL- $_2$ GPI non sono in grado di spiazzare l'annessina V da membrane pro-coagulanti, mentre l'annessina V è in grado di spiazzare la maggior parte dei complessi aPL- $_2$ GPI dalle stesse membrane. Gli anticorpi antifosfolipidi interferiscono con il metabolismo degli eicosanoidi.

Dopo l'iniziale dato dell'effetto inibitorio degli aPL sulla produzione endoteliale di PGI<sub>2</sub>, contrastanti risultati sono stati pubblicati riguardo all'effetto degli aPLsulla produzione di eicosanoidi da parte delle piastrine e delle cellule endoteliali. La spiegazione più plausibile per queste discrepanze risiede probabilmente nei tipi diversi di cellule endoteliali e nelle preparazioni differenti di aPL (per es. sieri interi o plasma o frazioni Ig) usate nonché nei differenti procedimenti tecnici.

In generale tuttavia, i risultati ottenuti sembrano indicare che lo sbilanciamento tra la produzione di trombossano  $A_2/\operatorname{PGI}_2$  pare essere imputabile più ad un'aumentata secrezione di trombossano  $A_2$  piuttosto che al coinvolgimento dell'epoprostenolo endoteliale.

Gli anticorpi antifosfolipidi interferiscono con la regolazione del tono vasale.

Il tono vasale è attivamente regolato dall'endotelio: uno spostamento verso la vasocostrizione potrebbe favorire la formazione del trombo. A supporto di questa ipotesi, Atsumi et al. riportano che i livelli plasmatici del peptide endotelina-1, il più potente fattore di contrazione di derivazione endoteliale, è correlato in maniera significativa con una storia di trombosi arteriosa in pazienti con APS. Inoltre, è stato dimostrato che l'incubazione in vitro di cellule endoteliali con anticorpi monoclonali umani anti- 2GPI aumenta l'espressione di mRNAdi preproendotelina-1.

Interazione degli anticorpi antifosfolipidi con gli endosomi endoteliali.

Un'altra interessante interazione tra gli aPL e le cellule endoteliali è stata dimostrata recentemente. Gli anticorpi possono essere internalizzati dalle cellule e accumulati negli endosomi tardivi; gli aPL reagiscono apparentemente con l'acido lisobisfosfatidico della membrana interna degli endosomi in maniera  $\,_2$ GPI-dipendente. Attraverso la modificazione del traffico intracellulare di proteine, gli aPLpossono contribuire a diversi dei meccanismi già menzionati.

### Le piastrine

Una lieve trombocitopenia è stata inizialmente riportata come una delle manifestazioni dell'APS, inoltre un ridotto numero di piastrine è stato trovato in modelli animali della sindrome. Nonostante la trombocitopenia non sia formalmente inclusa nei criteri classificatori dell' APS, uno studio multicentrico più recente riporta ancora una riduzione delle piastrine in APS associato a LES.

La trombocitopenia associata ad APS è stata attribuita ad un aumento dell'attivazione piastrinica in vivo e collegata allo stato trombofilico.

Un incremento dell'espressione di CD $_{63}$  piastrinico, esaminato mediante citofluorimetria ed un'elevazione dei livelli plasmatici di P-selectin solubile in 20 pazienti con APS primaria hanno suggerito più direttamente che ci sia un incremento dell'attivazione piastrinica in vivo in alcuni pazienti con APS primaria. Un altro studio riporta un'escrezione di 11-deidrotrombossano B $_2$  significativamente più alta in pazienti con LES, correlati con elevati livelli plasmatici dei frammenti 1 e 2 della protrombina, del fattore von Willebrandt, e di attivatore tissutale del plasminogeno. E' stato suggerito che livelli anormali di fattore di von Willebrandt e di attivatore tissutale del plasminogeno rappresentano parametri di perturbazione endoteliale, che possono stimolare l'attivazione piastrinica oppure favorirla attraverso la formazione del coagulo.

Gli autori ipotizzano che l'attivazione in vivo delle piastrine si verifichi quando la positività per aPL e la perturbazione endoteliale coesistono, mentre gli aPL di per se' non causano attivazione piastrinica.

La capacità degli aPLdi attivare direttamente le piastrine è ancora discussa. L'attivazione piastrinica non appare quindi essere direttamente correlata agli aPL, per lo meno negli esperimenti in vitro. L'attivazione può essere legata al rilascio di mediatori attivi da parte di altri tipi cellulari, quali le cellule endoteliali e i monociti, attivati dagli aPL o di prodotti della cascata coagulatoria.

### I monociti

I monociti possono svolgere un'azione procoagulante, principalmente legata all'epressione del Tissue Factor. L'attività procoagulante correlata all'espressione del Tissue Factor è stata riportata in monociti umani dopo incubazione con sieri positivi per aPL. E' interessante notare che in pazienti con APS primitiva o secondaria sono stati trovati livelli plasmatici significativamente elevati di Tissue Factor e di Tissue Factor Pathway Inhibitor, un regolatore fisiologico dell'attivazione della coagulazione Tissue Factor-dipenden-

te, suggerendo un'upregolazione in vivo della via del Tissue Factor. In accordo con questi dati, Dobado-Berrios et al., usando la trascrizione inversa e l'amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction, hanno evidenziato un più elevato accumulo di mRNA per Tissue Factor in monociti isolati da sangue fresco di pazienti con APS primaria rispetto ai controlli sani. L'analisi densitometrica ha inoltre mostrato che mRNA per Tissue Factor era maggiormente espresso nei monociti di pazienti con APS primaria con una storia di trombosi rispetto a quelli che non avevano mai avuto trombosi.

Un effetto diretto degli aPL nell'indurre un fenotipo procoagulante nei monociti è stato suggerito da tre studi che hanno studiato la capacità degli aPL monoclonali umani di incrementare sia mRNA del Tissue Factor sia l'attività procoagulante in vitro. In due studi è stato usato un anticorpo monoclonale umano che reagisce con la  $_2$ GPI e che ha un'attività tipo Lupus Anticoagulant. I risultati suggeriscono che la  $_2$ GPI (probabilmente la  $_2$ GPI espressa sulla membrana cellulare dei monociti) possa essere il bersaglio. L'isotipo IgM di questi anticorpi inoltre esclude la possibilità che il Fc possa essere coinvolto nella stimolazione dei monociti. In ogni caso sono stati riportati anche altri meccanismi: Visvanathan et al. hanno mostrato che linfociti T CD4 positivi specifici per  $_2$ GPI possono indurre l'aumento del Tissue Factor quando sono messi in co-coltura in presenza di  $_2$ GPI. Questi dati sono riportati solo in pazienti con manifestazioni della sindrome, ma non in soggetti aPL positivi senza sintomi clinici, o in soggetti sani.

Infine, se gli aPL sono associati con lo sviluppo di un fenotipo endoteliale proinfiammatorio e procoagulatorio, deve essere sottolineato che il reclutamento e l'adesione dei leucociti alla parete endoteliale termina in un'attivazione cellulare che può favorire l'espressione di un'attività procoagulante.

### I fosfolipidi

Le membrane cellulari sono costituite principalmente da fosfolipidi combinati con proteine. I fosfolipidi sono composti che mostrano una preponderanza di gruppi non polari, infatti sono molecole a catena aperta con un gruppo di testa polare (colorato in viola in figura 5) e due lunghe code non polari. In ambiente acquoso possono rapidamente formare un doppio strato chiuso.

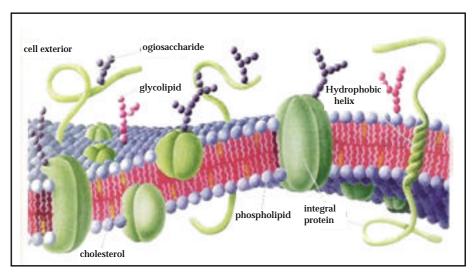


Figura 5. Modello "a mosaico fluido" della struttura della membrana.

I doppi strati lipidici sono disposti in modo che i gruppi di testa polari dei lipidi siano in contatto con l'ambiente acquoso, mentre non lo siano le code non polari. Le code non polari sono costituite da acidi grassi (colorati in rosa nella figura 5) formati da lunghe catene di atomi di carbonio e dal colesterolo.

### Gli anticorpi antifosfolipidi

Il termine "anticorpi antifosfolipidi", in senso stretto, raggruppa una larga famiglia di anticorpi che riconoscono altrettanto bene sia i fosfolipidi anionici sia quelli neutri (tabella 4).

Fosfolipidi anionici	Fosfolipidi neutri
Cardiolipina	Fosfatidiletanolamina (PE)
Fosfatidilserina (PS)	Sfingomielina
Acido fosfatidico	Fosfatidilcolina
Fosfatidilinositolo (PI)	
Fosfatidilglicerolo	
8	

Tabella 4. Fosfolipidi anionici e neutri.

Durante il decennio 1990-2000, in modo sempre più convincente, è stato osservato che questi anticorpi antifosfolipidi sono una grande ed eterogenea famiglia di immunoglobuline che, nonostante il loro nome, non si legano ai fosfolipidi, ma sono diretti contro proteine del plasma per affinità con anioni di superficie (il fosfolipide).

In occasione del IV Congresso Internazionale organizzato nel 1990 a Sirmione venne per la prima volta identificata la Beta-2-glicoproteina 1 ( <sub>2</sub>GPI) come il principale target anticorpale.

Ma la lista degli obiettivi antigenici di questi anticorpi includono anche altri antigeni, i cosiddetti "cofattori proteici" (tabella 5).

Gli aPL "convenzionali"	Gli altri antigeni degli aPL (i cofattori proteici)
Lupus Anticoagulant	<sub>2</sub> -glicoproteina I
Anticorpi anticardiolipina	Protrombina
•	Annessina V
	Proteina C (attivata)
	Proteina S
	Trombomodulina
	Chininogeni ad alto e basso peso molecolare
	Attivatore tissutale del plasminogeno
	Fattore XII della coagulazione
	Lipoproteine a bassa densità ossidate (ox-LDL)

Tabella 5. Anticorpi antifosfolipidi ed antigeni degli antifosfolipidi.

La maggior parte degli antigeni sono coinvolti nella coagulazione del sangue, ne deriva quindi che alcuni aPLpossono impedirne la regolazione (figura 6).

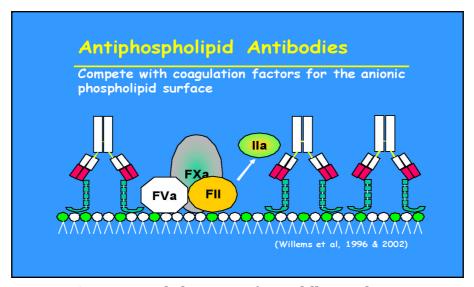


Figura 6. Competizione degli aPL con i fattori della coagulazione.

### Gli aPL "convenzionali":

### Il Lupus Anticoagulant (LAC)

E' un inibitore acquisito della coagulazione (anticoagulante circolante), identificabile con i metodi del laboratorio di emostasi.

Il plasma dei pazienti con APS tende a "non coagulare" nelle provette (in vitro); il suo nome ("anticoagulant") deriva appunto da questo effetto e dal fatto di essere stato identificato per la prima volta in un paziente affetto da Lupus Erythematosus Sistemico.

L'effetto anticoagulante è dovuto alla presenza degli anticorpi anti-fosfolipidi che impediscono la normale funzione dei fattori della coagulazione che contengono fosfolipidi.

Questo rappresenta un apparente paradosso biologico dal momento che la malattia si presenta come una aumentata tendenza alle trombosi. In realtà, mentre in vivo gli anticorpi interferiscono con diversi fattori della coagulazione (componenti plasmatici, cellule endoteliali, monociti, piastrine) determinando una tendenza alle trombosi, in vitro gli anticorpi possono solo agire con i componenti plasmatici dal momento che mancano gli altri. Il risultato dell' interferenza è appunto rappresentato da un ritardo nella formazione del coagulo.

### Il LAC:

- inibisce in vitro la disponibilità dei PL per l'attivazione:
- dei fattori X e IX da parte del complesso TF-VIIa;
- del fattore X da parte del complesso Ixa-VIIIa;
- della protrombina da parte del complesso Xa-Va.
- viene misurato da test fosfolipido-dipendenti (PT, PTT e derivati) che risultano variamente alterati e non si correggono dopo aggiunta di plasma normale;
- è un inibitore interferente (privo di specificità contro singoli fattori della coagulazione).

Il test per il LAC identifica anticorpi che interferiscono con i meccanismi della coagulazione; questi anticorpi determinano un prolungamento abnorme del tempo di coagulazione.

I criteri diagnostici per la determinazione del Lupus Anticoagulant (**linee guida SSC-ISTH** - Comitato Scientifico e di Standardizzazione della Società Internazionale per la Emostasi e la Trombosi) comprendono:

- a. prolungamento di almeno un test coagulativo fosfolipido-dipendente (screening);
- b. dimostrazione che l'anomalia è dovuta ad un inibitore e non a carenza di uno dei fattori della coagulazione (prove di incrocio con plasma normale);
- c. dimostrazione che l'inibitore è antifosfolipidico (test di conferma);
- d. dimostrazione di assenza di inibizione contro specifici fattori della coagulazione.

La tecnica per la ricerca del LAC, quindi, è complessa e comprende diverse tappe. Il LAC è un test "funzionale" che richiede di essere eseguito su campioni di plasma subito dopo il prelievo (anche se è possibile eseguire il test su campioni congelati con particolari accorgimenti, quali la conservazione a bassissime temperature).

Screening. In primo luogo è necessaria la dimostrazione di un significativo prolungamento di (o dei) test di coagulazione fosfolipidi-dipendenti: i tests più diffusi comprendono la determinazione del Tempo di Tromboplastina Parziale Attivata (aPTT), del Tempo di Coagulazione al Caolino (KCT) e il test al Veleno di Vipera Russel diluito (dRVVT).

Prove di incrocio. Qualora i tempi di coagulazione risultino superiori a quelli di normalità, occorre escludere tutte le cause – diverse dagli antifosfolipidi - che possono determinare un allungamento del tempo di coagulazione. Ad esempio, si deve escludere un deficit congenito o acquisto di fattori della coagulazione. A questo scopo si mescola il campione del paziente con un plasma normale, se persiste l'allungamento del tempo di coagulazione questo non è verosimilmente dipendente dalla mancanza di qualche fattore della coagulazione: infatti il plasma normale aggiunge nella provetta tutti i fattori necessari. Quindi l'alterazione può essere dovuta agli anti-fosfolipidi.

Test di conferma. L'ultima tappa consiste nella dimostrazione che l'aggiunta di fosfolipidi (lisato piastrinico o fosfolipidi a conformazione esagonale) al plasma del paziente è in grado di correggere il tempo di coagulazione prima prolungato: l'eccesso di fosfolipidi, saturando gli anticorpi, corregge il test normalizzando il tempo per la formazione del coagulo.

### Gli anticorpi anticardiolipina (aCL)

La cardiolipina è un fosfolipide anionico. E' un costituente della membrana interna dei mitocondri e recentemente ne è stata dimostrata la presenza nel plasma complessato a lipoproteine e sulla superficie delle cellule apoptotiche E' la forma ossidata della cardiolipina che viene principalmente riconosciuta dagli aCL, i quali reagiscono contro neo-epitopi presenti sulla cardiolipina ossidata.

Gli aCLriconoscono non solo la cardiolipina ma anche gli altri fosfolipidi anionici: fosfatidilglicerolo, fosfatidilinositolo e fosfatidilserina.

Il test degli anticorpi anticardiolipina è a tutt'oggi probabilmente il mezzo più usato per la diagnosi della Sindrome da Anticorpi Antifosfolipi.

Si devono però distinguere gli aCL per i quali la reattività nei confronti della cardiolipina non è dipendente dalla presenza di un cofattore plasmatico nel mezzo di reazione ("veri" aCL) da quelli "dipendenti", che cioè riconoscono un complesso cardiolipina-cofattore, nei quali essi stessi possono addirittura essere il cofattore: i primi sono essenzialmente ritrovati in corso di <u>infezioni</u> mentre gli altri sono presenti in corso di <u>malattie autoimmuni</u>, come l'APS.

La <sub>2</sub>GPI è stata identificata come principale cofattore degli aCL.

In corso di APS, gli aCL sono nella maggior parte dei casi d'isotipo IgG. L'isotipo IgM è più raro e spesso associato all'isotipo IgG. Si può ritrovarlo isolato, ma in questo caso la sua presenza transitoria ed associata ad un contesto infettivo o alla somministrazione di determinate terapie (in particolare gli antiepilettici).

La presenza di aCL di isotipo IgA è eccezionale in corso di APS ed anch'essa associata all'isotipo IgG, quindi la loro ricerca in routine non ha particolare importanza nella diagnosi di questa sindrome.

Ad ogni modo la determinazione dei singoli isotipi anticorpali può fornire risultati differenziati e utili indicazioni sulla particolarità delle manifestazioni cliniche.

Alcuni autori hanno rilevato che:

- gli anticorpi IgA correlano meglio delle IgG od IgM con la trombocitopenia.
- IgM ed IgAcorrelano con l'anemia emolitica, in pazienti affetti da LES.
- le IgA sono state rilevate anche nella sindrome Guillain-Barré, nella sindrome di Sjögren, nell'artrite reumatoide, nella sclerosi sistemica.
- titoli elevati di IgG e IgM indicano una affezione endocardica.

Il test per l'anti-cardiolipina (aCL) è stato messo a punto<sup>(5)</sup> nel tentativo di individuare direttamente la presenza degli anticorpi anti-fosfolipidi sfruttando le loro caratteristiche di legame indipendentemente dagli effetti funzionali. A tale scopo è stato visto che, legando i fosfolipidi (in particolare la cardiolipina) alla plastica di speciali piastre, questi vengono riconosciuti

dagli anticorpi. Si può quindi determinare la presenza degli anti-fosfolipidi nel siero del paziente svelandone il legame mediante una tecnica detta immuno-enzimatica (o ELISA).

Il test viene eseguito generalmente sul siero e questo consente la sua esecuzione anche in campioni conservati senza particolari accorgimenti, è più semplice del LAC ed in una seduta si possono analizzare molti più campioni. Inoltre la metodica è semi-quantitativa, permettendo così di valutare la quantità di anticorpi presenti nel campione (titolo basso, medio o elevato) e l'identificazione di anticorpi appartenenti a tipi diversi di immunoglobuline (IgG, IgM, IgA).

Attualmente la metodica è eseguita in maniera tale da evidenziare anticorpi che richiedono per la loro determinazione la presenza di un cofattore, la beta 2 glicoproteina I. Quest'ultima è una proteina normalmente presente nel siero che legandosi ai fosfolipidi determina un complesso che viene a sua volta riconosciuto dagli anticorpi associati con le manifestazioni cliniche della sindrome.

### Gli anticorpi antifosfatidiletanolamina (aPE)

La fosfatidiletanolamina (PE) è un fosfolipide neutro identificato come un componente maggiore della membrana cellulare dove la si ritrova in differenti conformazioni nonbilaterali, più spesso esagonali o lamellari in doppio strato.

La struttura in doppio strato è la più frequente.

La fase esagonale è caratterizzata da una struttura cilindrica con le teste polari dei fosfolipidi orientati verso canali acquei situati all'esterno (fase I o Hex I PE) o all'interno (fase II o Hex II PE) del cilindro. A seconda del contenuto in colesterolo, dell'ambiente ionico o proteico, la fosfatidiletanolamina può passare dalla fase I alla fase II.

La fosfatidiletanolamina gioca un ruolo importante nel corso di numerose tappe della coagulazione, in particolare nella via della proteina C. Infine, quando è sottoforma Hex II PE, essa è immunogena in vivo mentre in vitro riesce a neutralizzare l'attività anticoagulante del LAC.

E' ormai ampiamente documentato che gli anticorpi antifosfatidiletanolamina sono diretti contro i fosfolipidi anionici. Tuttavia studi recenti hanno dimostrato come questi anticorpi siano stati ritrovati in assenza di altri aPLs in pazienti che presentavano episodi tromboembolici e/o perdite fetali reicidivanti, ma anche altri sintomi associati alla APS.

Alcuni anticorpi antifosfatidiletanolamina sono dipendenti da cofattori

plasmatici come il chininogeno ad alto e basso peso molecolare <sup>(6)</sup>: essi riconoscono sul chininogeno un epitopo conformazionale espresso solamente dopo la loro interazione con la fosfatidiletanolamina. Alcune proteine complessate al chininogeno ad alto peso molecolare, come la precallicreina o il fattore XI, possono esse stesse giocare il ruolo di cofattore.

Il carattere di dipendenza o meno degli anticorpi antifosfatidiletanolamina è legato all'isotipo e non al contesto clinico associato. Contrariamente agli anticorpi antifosfatidiletanolamina di isotipo IgM, quelli di isotipo IgG sono fortemente dipendenti dalla presenza di cofattori plasmatici.

A causa dell'assenza di standardizzazione e della necessità di confermare il loro interesse clinico attraverso studi multicentrici, la ricerca di questi anticorpi non è ancora praticata in routine nella maggior parte dei laboratori.

### Gli anticorpi antifosfatidilserina (aPS) Gli anticorpi antifosfatidilinositolo (aPI) Gli anticorpi anti acido fosfatidico (aPA)

Sotto l'acronimo aPLviene comunemente compresa una famiglia eterogenea di IgG, IgM, (IgA) a lungo considerate con specificità per i PL anionici quali PS (fosfatidilserina), PI (fosfatidilinositolo) e PA (acido fosfatidico).

Il marker sierologico tipico della sindrome é stata considerata a lungo la presenza di anticorpi anticardiolipina (aCL), anche se in realtà é subito apparso chiaro che questi anticorpi riconoscevano non solo la cardiolipina ma tutta la famiglia di fosfolipidi a carica elettrica negativa come d'altra parte era già stato dimostrato per gli anticorpi responsabili del LAC.

La cardiolipina, utilizzata come antigene nel test in fase solida ragioni storiche, é una molecola molto poco rappresentata nei sistemi biologici essendo in effetti relegata alla faccia interna della membrana mitocondriale. Al contrario la fosfatidilserina (PS), un altro fosfolipide a carica elettrica negativa, fa parte della superficie interna di tutte le membrane cellulari e viene esposta all'esterno quando le cellule sono attivate. Per questo motivo già nel 1987 era stato allestito un test immunoenzimatico per la ricerca di anticorpi antifosfatidilserina (aPS) che apparentemente permetteva una migliore definizione dei pazienti con patologia trombotica: oggi è accertato che questi anticorpi correlano meglio con la presenza di LA che gli aCL e possono ritrovarsi in sieri aCL-negativi di pazienti affetti da LES.

Così come la fosfatidilserina, gli altri fosfolipidi anionici componenti della membrana cellulare, sono bersagli degli aPLe, come tali, sono utilizzati nelle

diverse metodiche di rilevazione anticorpale anche se successivamente è stato scoperto che il loro legame a questi anticorpi è reso possibile dalla presenza di un "cofattore".

### La beta 2 glicoproteina 1

Nel 1989 McNeil et al. scoprirono che l'apporto del plasma umano o bovino era necessario per permettere il legame di alcuni aPLai fosfolipidi: questa data segna la nascita dell'idea della presenza di un "co-fattore".

Nel 1990 tre diversi gruppi di ricercatori<sup>(7)</sup>(8) hanno indipendentemente segnalato che la reazione verso i fosfolipidi a carica elettrica negativa posti in fase solida era possibile solo in presenza di una proteina sierica definita, appunto, "co-fattore".

Tutti i gruppi hanno identificato il cofattore nella Beta 2 glicoproteina 1

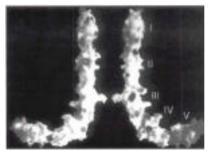


Figura 7. Struttura tridimensionale della beta-2 glicoproteina I.

(  $_2$ GPI), una apolipoproteina presente in quantità elevata nel plasma di soggetti normali (alla concentrazione di 0,2 mg/ml), dal peso molecolare di 50 Kd (in condizioni non ridotte), che sale a 70 KD dopo riduzione con -mercaptoetanolo (figura 7).

### Caratteristiche biochimiche e funzionali

E' una singola catena polipeptidica costituita da 326 aminoacidi (in prevalenza prolina, cisteina e triptofano) e da 5 oligosaccaridi contenenti glicosammina che contiene 11 ponti disolfuro, è sintetizzata principalmente dagli

epatociti, ma anche da altri tipi cellulari come cellule endoteliali, neuroni e linfociti.

Ha una concentrazione plasmatica di 0.2~mg/mL; il 60~% di essa circola legata alle lipoproteine, mentre il restante 40~% si ritrova in forma libera ed è quella funzionalmente attiva.

E' stata definita apolipoproteina H<sup>(9)</sup> perché presente nei chilomicroni, VLDL, HDL e soprattutto nella frazione lipoproteica pesante. Oggi sembra che solo piccole quantità di proteina siano legate alle lipoproteine.

La 2GPI sembra anche coinvolta nella rimozione di particelle "non-self" e nel processo dell'apoptosi.

Le caratteristiche biochimiche e funzionali di questa molecola sono riportate nella tabella 6.

### **CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE**

### Polipeptide monocatenario

- 326 aminoacidi
- fortemente glicosilato (20%)
- PM: 50 KD
- 5 domini ripetitivi da 60 aminoacidi
- forte omologia interspecie
- polimorfismo allelico: 4 isoforme descritte
- concentrazione plasmatica: da 60 a 300 mg/l

### PROPRIETA'

Legame con molecole cariche negativamente

- FOSFOLIPIDI ANIONICI
- PIASTRINE
- DNA
- EPARINA
- MITOCONDRI

### **FUNZIONI**

In vitro: inibizione della

- conversione protrombina-trombina
- attivazione della via intrinseca della cascata coagulativa
- attivazione della proteina C
- aggregazione piastrinica

In vivo: funzioni sconosciute

Tabella 6. Caratteristiche biochimiche e funzionali.

### Genetica

Mediante tecniche di clonaggio e sequenziamento del c-DNA è stata stabilita la completa e corretta sequenza aminoacidica della proteina la quale risulta altamente conservata per più dell'80% fra le diverse specie animali (umana, bovina, murina).

Il gene della <sub>2</sub>GPI umana è situato sul cromosoma 17 (q23-qter).

Questa proteina è costituita da 5 subunità dette "sushi domains" (Figura 8), di cui 4 molto simili ed una leggermente diversa, situata nel V dominio.

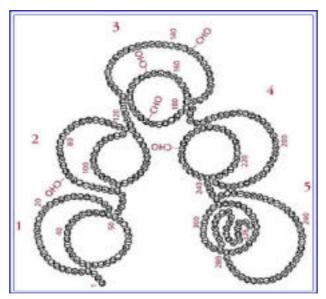


Figura 8. La sequenza aminoacidica della 2GPI umana (sushi domains).

Il V dominio contiene la sequenza che determina il legame della  $\,_2$ GPI ai fosfolipidi: il sito è stato identificato da numerosi studi come quello localizzato fra gli aminoacidi Cys 281-288.

La  $_2$ GPI è, infatti, una proteina altamente cationica (specialmente in questa sequenza) che, in quanto dotata di carica positiva, si lega facilmente a componenti caricati negativamente  $^{(10)}$ , quali ad esempio, la cardiolipina o i fosfolipidi negativi.

La sequenza carica positivamente CKNKEKKC presente nel V dominio (Ser 311 - Lys 317) ed il vicino uncino idrofobico sembrano essere coinvolti

rispettivamente nel legame della proteina ai fosfolipidi anionici e al suo ancoraggio sulle membrane cellulari (figura 9).

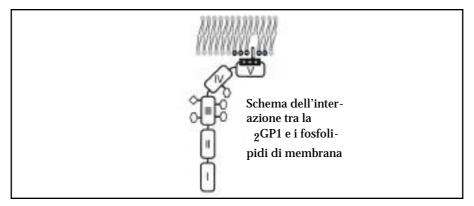


Figura 9. Interazione tra 2GPI e fosfolipidi di membrana.

Per quanto riguarda gli altri domini sembra che il III ed il IV, fortemente glicosilati, siano protetti dalle interazioni proteina-proteina, mentre i domini I e II rappresentano i siti di legame riconosciuti dagli anticorpi anti-  $_2$ GPI: gli epitopi maggiormente conosciuti come siti degli anticorpi anti-  $_2$ GPI sono situati sul I dominio $^{(11)}$ .

A tutt'oggi sono stati identificati ben 4 polimorfismi, dovuti a mutazioni puntiformi, responsabili di precise sostituzioni aminoacidiche: Ser/Asn 88, Leu/Val 247, Cys/Gly 306, Trp/Ser 316. La differenza anche di un solo aminoacido può portare ad anomale modificazioni conformazionali della proteina, in seguito ad alterate interazioni con i fosfolipidi di membrana.

Polimorfismi sul sito di legame per i fosfolipidi, oppure sul sito antigenico della 2GPI potrebbero influenzare la produzione di anticorpi anti-2GPI e lo sviluppo della APS.

### Meccanismo patogenetico

Riguardo al possibile meccanismo patogenetico delle manifestazioni trombotiche alcuni studi hanno dimostrato che gli anticorpi anti- 2GPI sono in grado di diminuire l'attività anticoagulante della proteina C attivata e di aumentare l'escrezione urinaria del metabolita piastrinico del trombossano suggerendo, così, implicazioni a vario livello nella patogenesi delle trombosi.

Inoltre è stato dimostrato che gli anticorpi anti- <sub>2</sub>GPI riconoscono la <sub>2</sub>GPI adesa alle cellule endoteliali umane quando viene aggiunto un siero contenente, appunto <sub>2</sub>GPI, mentre in sua assenza gli anticorpi non sono in grado di reagire. Questo fenomeno non è confinato solo a cellule endoteliali ottenute da grossi vasi venosi, ma è riproducibile anche con cellule endoteliali umane del microcircolo cerebrale o cutaneo.

Una volta legati, gli anticorpi anti- <sub>2</sub>GPI determinano una attivazione delle cellule (fenotipo endoteliale pro-adesivo, pro-infiammatorio e pro-coagulante), favorendo la tendenza trombotica.

E' stato dimostrato che in alcuni pazienti con manifestazioni cliniche tipiche della sindrome da anticorpi antifosfolipidi primitiva e/o secondaria sono presenti esclusivamente anticorpi anti- 2GPI in assenza di anticorpi anticardiolipina e di altri anticorpi antifosfolipidi.

Da uno studio condotto recentemente presso l'Università di Siena è stato dimostrato che il rischio trombotico degli anticorpi anti- 2GPI è almeno pari a quello degli anticorpi anticardiolipina. Pertanto nella diagnosi delle sindromi da anticorpi antifosfolipidi si ricorre ai test specifici per la rilevazione di anticorpi anti beta 2 glicoproteina di classe IgG, IgM, IgAnei casi in cui la rilevazione degli anticorpi anticardiolipina-cofattore (ACA) risulti negativa. Alcuni laboratori hanno scelto di saggiare routinariamente la 2GPI in parallelo alla ricerca degli ACA.

### Metodiche usate per lo screening della 2GPI

Considerando che la 2GPI è rappresentata in buona quantità nel siero di tutti i mammiferi e quindi anche nel siero bovino oltre che umano, il siero bovino è stato largamente impiegato nei test ELISA per la rivelazione degli aCL.

Infatti nelle piastre copulate con la sola cardiolipina (o con fosfolipidi a carica elettrica negativa) la maggior parte dei sieri dei pazienti affetti da APS non manifesta alcun legame. Al contrario, se al fosfolipide adeso alla piastra si aggiunge il co-fattore (la 2GPI), si forma un complesso che viene in questo caso riconosciuto dall'anticorpo.

Ancora in discussione è la spiegazione di questo fenomeno.

Un'ipotesi sostiene che il complesso 2GPI-fosfolipide induca un'alterazione conformazionale nella struttura della molecola: questa passerebbe da una forma lamellare ad una esagonale. I neo-epitopi espressi verrebbero così riconosciuti dagli autoanticorpi che, d'altra parte, non sembrano reagire (o lo fanno con avidità estremamente minore) con la molecola libera in fase fluida.

L'ipotesi alternativa prevede che non sia necessaria la comparsa di neoepitopi sulla molecola, infatti sarebbe il legame della <sub>2</sub>GPI sia ai fosfolipidi negativi sia alle strutture a carica elettrica negativa delle piastre irradiate a favorire l'adesione di un numero maggiore di molecole. Ciò risulterebbe in una maggiore densità antigenica che, a sua volta, favorirebbe il legame degli anticorpi. Questi ultimi, infatti, sono anticorpi a bassa affinità e, come tali, per legarsi in modo valido, richiedono che il loro antigene, la  $_2$ GPI, sia concentrato e non disperso come nelle piastre non trattate.

Studi effettuati utilizzando anticorpi anti- <sub>2</sub>GPI purificati per affinità da sieri di pazienti hanno dimostrato che:

- gli anticorpi reagiscono con la <sub>2</sub>GPI in assenza di fosfolipidi, dimostrando così la propria specificità per la proteina;
- 2. gli anticorpi riconoscono la <sub>2</sub>GPI anche se proveniente da specie differente (è noto che la <sub>2</sub>GPI presenta un'ampia omologia tra specie diverse);
- 3. gli anti- 2GPI sono anticorpi a bassa affinità.

Inoltre è noto che questi anticorpi comprendono specificità dirette verso epitopi della molecola espressi nelle diverse subunità (II, III, IV e V dominio).

### La protrombina

Bewers et al. descrivono, nel 1991, un secondo cofattore, la protrombina. La protrombina umana, o fattore II, con il fattore Va, il fattore Xa, i fosfolipidi (della membrana piastrinica-FP3, endoteliale, leucocitaria) e gli ioni calcio, forma un complesso multimolecolare che prende il nome di <u>protrombinasi</u> o complesso protrombinasico (figura 10), in grado di agire proteoliticamente sulla protrombina trasformandola in trombina.

La trombina (FIIa) viene formata a partire dallo <u>zimogeno protrombina</u> (FII) attraverso due tagli proteolitici operati dal FXa.

La protrombina è una glicoproteina plasmatica di 582 aminoacidi, la cui sintesi è vit. K dipendente, contenente nella regione amino-terminale residui di acido gammacarbossiglutammico attraverso i quali si lega, in presenza di ioni calcio che fanno da ponte, al fosfolipide piastrinico. Dopo il primo taglio si formano due frammenti, uno amino-terminale e l'altro carbossi-terminale (pretrombina 2), a singola catena, contenente un ponte disolfuro. Un secondo taglio all'interno della pretrombina 2 porta alla formazione di trombina attiva (a-trombina) costituita da due catene unite dal ponte S-S.

E' sulla parte N-terminale della protrombina (dominio GLA) che si trova

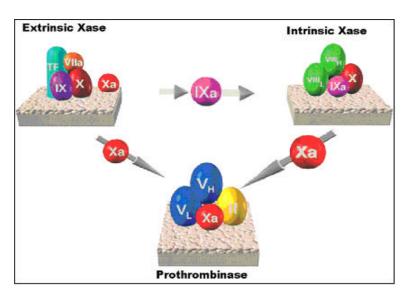


Figura 10. Il complesso protrombinasi..

il sito di legame ai fosfolipidi anionici. Il lavoro di Rao e coll. <sup>(12)</sup> suggerisce che gli anticorpi anti-protrombina (anti-PT) possono aumentare l'affinità della protrombina per i fosfolipidi anionici e che i complessi PT-anti-PT inibiscono il legame degli altri fattori della coagulazione ai fosfolipidi anionici.

Questi anticorpi si ritrovano in percentuale maggiore nei soggetti affetti da LES (50-60%) rispetto agli aCL e agli anti- <sub>2</sub>GPI e costituiscono un fattore di rischio indipendente per trombosi venosa ed arteriosa<sup>(13)</sup>. Anche nei pazienti con APS, la contestuale presenza di anticorpi anti-protrombina si associa ad un maggior rischio di eventi trombotici<sup>(14)</sup>.

### Gli epitopi della protrombina

L'epitopo (o gli epitopi) riconosciuto dagli anticorpi antiprotrombina non è stato definito ancora pienamente. Bajaj et al. (15) riportarono due casi di pazienti con Lupus Anticoagulant (LA) e ipoprotrombinemia severa, mostrando che il plasma di un paziente non solo reagiva con la <u>protrombina</u>, ma anche con <u>pretrombina 1</u> (segmento carbossi-terminale della protrombina) e <u>DIP--trombina</u> (segmento carbossi-terminale della pretrombina 1). Nessuna reattività è stata provata contro il frammento 1 (segmento aminoterminale della protrombina) o contro il frammento 2 (segmento aminoterminale della pretrombina 1) (Figura 11).

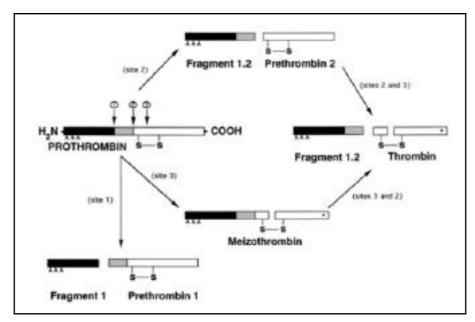


Figura 11. Vie diverse dell'attivazione della protrombina.

- (\*) indica il sito esposto.
- (Y invertito) indica l'acido carbossiglutamico.

Successivamente venne studiato il legame di 14 preparati di LAC IgG positivi alla protrombina, alla pretrombina 1, al frammento 1 (figura 12) e alla trombina che riveste le piastre ELISA: 11 IgG si legarono alla protrombina, 8 alla pretrombina 1 e al frammento 1. Nessuno reagì con la trombina adesa alla piastra. Questi dati furono confermati da Malia<sup>(16)</sup> et al. che scoprirono che gli anticorpi antiprotrombina reagivano con la protrombina ed il suo frammento 1-2, ma non con la molecola decarbossilata.

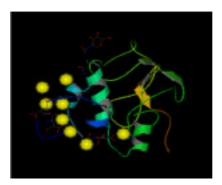


Figura 12. Frammento I della protrombina complessato con stronzio.

Puurunen et al. (17)(18) scoprirono che gli anticorpi antiprotrombina cross-reagivano con il plasminogeno in pazienti con infarto del miocardio. Studi di inibizione dimostrarono che il legame dell'anticorpo alla protrombina viene impedito da protrombina solubile, plasminogeno e da peptidi sintetici di 20 aminoacidi. Questa cross-reattività è stata confermata immunizzando topi con protrombina umana o plasminogeno umano. Tutti i campioni di plasma da 16 topi immunizzati con protrombina avevano anticorpi antiprotrombina e 13 cross-reagivano con il plasminogeno. Tutti i campioni di plasma prelevati da 12 topi immunizzati con plasminogeno contenevano anticorpi antiplasminogeno e 8 cross-reagivano con la protrombina. Fu formulata l'ipotesi che anticorpi antiprotrombina che cross-reagivano con il plasminogeno interferivano con la via fibrinolitica.

#### Le proprietà anticoagulanti della protrombina

Nel 1991 un gruppo di ricercatori<sup>(19)</sup> caratterizzò l'attività del Lupus Anticoagulant di due pazienti con inibitori fosfolipide-dipendenti della coagulazione: essi osservarono che anticorpi IgG purificati impedivano l'attivazione della protrombina con i fattori di coagulazione Xa e Va su un fosfolipide di superficie caricato negativamente in presenza di ioni calcio.

Una rappresentazione schematica dei siti di azione di aPT ed aCL, anti-<sub>2</sub>GPI, anticorpi lungo la cascata di coagulazione sono mostrati in figura 13.

L'attività anticoagulante era esercitata sulla protrombina umana ma non su quella bovina ed era indipendente dalla fonte (umana o bovina) di fattori Xa e Va; i fosfolipidi anionici erano un requisito assoluto per l'espressione di questa attività anticoagulante. Essi conclusero che anticorpi diretti verso il complesso protrombina/fosfolipide erano responsabili dell'attività del Lupus Anticoagulant. Gli anticorpi antiprotrombina impedivano inoltre la conversione del fattore X dai fattori di coagulazione IXa e VIII, a patto che la protrombina, i fosfolipidi anionici e il calcio fossero presenti.

L'attività anticoagulante degli anticorpi antiprotrombina è espressa principalmente, sebbene non esclusivamente, contro <u>protrombina di origine umana</u> ma non animale. La ragione di questa specie-specificità non è conosciuta.

Sebbene l'antiprotrombina e gli anticorpi anticardiolipina siano dotati di attività lupus-anticoagulante, essi influenzano la coagulazione fosfolipide-dipendente in differenti tests. Gli effetti sinergici degli anticorpi antiprotrombina su due consecutivi metodi di coagulazione fosfolipide-dipendenti sono mostrati da tutti i tests, principalmente da tests quali il tempo di coagulazione con caolino (KCT) o il tempo di coagulazione con silice colloidale

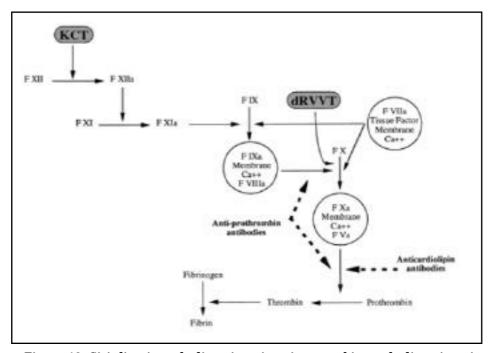


Figura 13. Siti di azione degli anticorpi antiprotrombina e degli anticorpi anticardiolipina lungo la cascata coagulativa: gli anticorpi antiprotrombi - na interdicono l'attivazione del fattore X e della protrombina; gli anticorpi anticardiolipina interdicono la protrombina ma non l'attivazione del fatto - re X. Le linee tratteggiate indicano l'effetto inibitorio.

(CSCT), che procede attraverso la produzione di fattore Xa e l'attivazione di protrombina. Test fosfolipide-dipendenti come il tempo di coagulazione con veleno di vipera di Russell diluito (dRVVT), che selettivamente valuta la conversione di protrombina in trombina, presenta una minore sensibilità all'attività anticoagulante di questi anticorpi.

Gli anticorpi anticardiolipina impediscono l'attivazione della protrombina in modo rigorosamente beta-2-glicoproteina-dipendente, ma non quello del fattore X; di conseguenza, la loro presenza influenza il dRVVT più del KCT o di altri tests coagulativi.

L'attività del LA causata dagli anticorpi antiprotrombina può essere distinta precisamente da quella degli anticorpi anticardiolipina usati nei profili specifici di coagulazione comparando le ratio del KCT ed il dRVVT: se il rapporto del KCT è superiore a quello del dRVVT, il profilo di coagulazione viene associato agli anticorpi antiprotrombina; se invece il rapporto è il contrario il profilo di coagulazione di "dRVVT" può essere associato con anticorpi anticardiolipina.

Tuttavia, entrambi gli inibitori possono contribuire simultaneamente all'attività anticoagulante fosfolipide-dipendente. Effettivamente, la loro alta prevalenza suggerisce che antiprotrombina ed anticorpi anticardiolipina siano spesso presenti quando è presente il LA.

Questo è sostenuto dai recenti studi di Horbach et al. (20) in 28 pazienti con LA: è stato dimostrato che l'attività anticoagulante era totalmente dipendente dall'antiprotrombina o dagli anticorpi anti- 2GPI in 4 e 7 casi rispettivamente, mentre nella maggioranza dei casi (17) entrambi gli anticorpi contribuivano all'attività anticoagulante fosfolipide-dipendente. Queste scoperte ci inducono a suggerire che quando entrambi gli inibitori sono presenti, il più forte è responsabile degli effetti in uno dei due tests dRVVT o KCT.

#### Metodiche usate per lo screening della protrombina

La doppia immunodiffusione e la immunoelettroforesi furono le prime tecniche usate per lo screening degli anticorpi antiprotrombina. Il loro vantaggio principale era la possibilità di individuare complessi immuni protrombina/antiprotrombina: questo ritrovamento in vitro fece presumere che tali complessi erano anche presenti nel plasma in vivo. Il loro svantaggio principale era che questi metodi non provvedevano ad una stima quantitativa dell'anticorpo. In alcuni casi, inoltre, il titolo o l'affinità degli anticorpi antiprotrombina era troppo bassa per dare inequivocabili titolo di precipitine.

Le altre tecniche sono basate sull'inattivazione della protrombina da parte degli anricorpi antiprotrombina (vedi sotto). L'isolamento di anticorpi antiprotrombina e la purificazione dei fattori di coagulazione, comunque, costituiscono dei metodi inadatti alla valutazione routinaria di grandi numeri di pazienti con anticorpi antifosfolipidi.

Negli ultimi anni molti gruppi di ricercatori hanno sviluppato immunoassay enzima-linked (ELISA), metodi che ora sono i più usati. Essi danno una determinazione rapida del titolo e l'isotipo degli anticorpi antiprotrombina. Gli anticorpi antiprotrombina legano la protrombina immobilizzata su piastre di polistirene gamma-irradiate oppure di PVC altamente irradiate ma non su semplici piastre di polistirene. Anticorpi IgG e/o IgM di protrombina umana in fase solida sono stati riscontrati in circa la metà dei pazienti con anticorpi antifosfolipidi.

Gli anticorpi antiprotrombina riconoscono protrombina umana e bovina, anche se la molecola umana è un migliore antigene.

La protrombina è riconosciuta più efficientemente quando la proteina è legata ad una piastra ELISA rivestita con fosfatidilserina in presenza di ioni calcio: in questo caso la prevalenza di campioni positivi aumenta del 90%. Questo può essere spiegato in modi diversi. In primo luogo, diversamente

dalla protrombina legata a PVC che è verosimilmente ristretta nei suoi movimenti laterali, la protrombina complessata alla fosfatidilserina può formare cluster e orientarsi correttamente, offrendo le migliori condizioni vincolanti agli anticorpi. Alternativamente, l'ELISA con fosfatidilserina in fase solida può, attraverso gli ioni calcio, catturare il complesso protrombina-antiprotrombina circolante che è presente nel campione. Infine, gli anticorpi antiprotrombina reagirebbero con neoepitopi che la protrombina rende disponibili solamente quando è legata a fosfatidilserina attraverso ioni calcio.

Recentemente è stato evidenziato da Rauch<sup>(21)</sup>(22) che questi anticorpi antiprotrombina riconoscono la protrombina anche quando si legano alla fosfatidiletanolamina in fase esagonale (II) e che l'attività del Lupus Anticoagulant nel plasma è specificamente neutralizzata dal complesso protrombina/fosfatidiletanolamina in fase esagonale (fase II).

## Il legame

Il comportamento generale di anticorpi antiprotrombina in ELISA somiglia molto a quello degli anticorpi anticardiolipina: infatti questi anticorpi per riconoscere la 2GPI (così come gli aPT nei confronti della protrombina) necessitano che questa sia precedentemente legata ad una superficie negativa, quindi a dei fosfolipidi anionici o a delle piastre PVC ELISA oppure a polistirene gammairradiato.

I requisiti per il legame sono probabilmente la causa della relativamente bassa affinità di anticorpi anticardiolipina per  $_2$ GPI; i kd apparentemente variano da  $10^6$  a  $10^5$ .

Studi cinetici hanno mostrato che alcuni anticorpi anticardiolipina con attività anticoagulante causano un aumento di 30 – 40 ripiegamenti di  $_2$ GPI che si legano a membrane che contengono 20% di fosfatidilserina.

Inoltre una piastra ELISA gamma-irradiata aumenta la densità di superficie di  $_2$ GPI approssimativamente di 1.5 volte ed induce il suo cambio conformazionale. L'antineoepitopo(i) o la natura di bassa affinità dell'anticorpo anti-  $_2$ GPI deve ancora essere chiarito.

Similmente, l'evidenza sperimentale non stabilisce chiaramente se e quali anticorpi antiprotrombina sono antineoepitopo(i) o anticorpi di bassa-affinità. Riguardo alla prima possibilità, è stato dimostrato che la protrombina umana per subire un cambio conformazionale si deve legare a superfici contenenti fosfatidilserina in presenza di ioni calcio.

Gli aPT, come gli anticorpi anti-  $_2$ GPI, riducono il kd della protrombina legata ad un fosfolipide anionico di superficie da 2.5 a 5.0 volte (da 822  $\pm$  150 nmol/L a 184 a 341 nmol/L).

La tabella 7 compendia le proprietà di aPT e aCL.

	Anticorpi antiprotrombina	Anticorpi anticardiolipina
Antigene	Protrombina	<sub>2</sub> GPI, cardiolipina
Epitopi	Frammento 1 Pretrombina 1	Domini 1 e 4
Specie-specificità	Soprattutto umana	Umana, bovina, murina,
	-	ovina
Affinità	Soprattutto bassa	Bassa
Attività LAC	Si	Si
Prevalenza nella APS	50-90% (dipendente dalla presentazione dell'antigene)	60-90% (dipendente dalla presentazione dell'antigene)

Tabella 7. Proprietà principali di antiprotrombina ed anticardiolipina.

Comunque, Bajaj $^{(23)}$  et al. riportarono valori piuttosto alti per l'affinità di anticorpi antiprotrombina per protrombina umana, circa  $^{10^{10}}$ - $^{10^{9}}$  in pazienti LA-positivi con ipoprotrombinemia. In pazienti con livelli antigenici normali di protrombina ci si aspettava teoreticamente anticorpi di bassa-affinità. Questo fu suggerito indirettamente da Fleck et al. che riportarono il caso di un paziente in cui la protrombina del plasma era essenzialmente libera, non legata ad IgG, nonostante la presenza di anticorpi antiprotrombina che potevano essere rimossi da assorbimento ripetuto con protrombina insolubile. Il kd di questo tipo di anticorpo non è stato ancora determinato formalmente.

#### **Patofisiologia**

Anche a livello patofisiologico vi è incertezza. Nonostante il loro comportamento come Lupus Anticoagulant (LA) in prove di coagulazione in vitro, gli anticorpi antiprotrombina aumentano la generazione di trombina sulle cellule endoteliali di superficie e nel torrente sanguigno (in vivo). Queste scoperte, ottenute con un numero molto limitato di campioni di Ig, probabilmente sono dovute all'effetto stabilizzante degli anticorpi antiprotrombina sul legame della protrombina alla superficie di fosfolipide menzionata sopra e suggeriscono che gli anticorpi antiprotrombina con attività lupus-anticoagulante abbiano un effetto protrombotico.

Risultati contraddittori sono stati riportati sull'effetto di anticorpi antiprotrombina sull'attività anticoagulante della proteina C. Una pubblicazione di Horbach et al. $^{(24)}$  provò un danneggiamento significativo dell'attività della proteina C da parte di anticorpi antiprotrombina in presenza di protrombina umana.

In conclusione, anticorpi antiprotrombina sono frequentemente trovati in pazienti con anticorpi antifosfolipidi. Le loro proprietà immunologiche e funzionali variano, dipendendo principalmente dalla loro affinità per la protrombina umana. Nonostante la conoscenza sul loro meccanismo(i) di azione sia in aumento, l'attinenza clinica di questi anticorpi non è stata stabilita ancora.

E' ancora da definire se, come e quanto questi anticorpi svolgano un ruolo importante nella patogenesi della sindrome da anticorpi antifosfolipidi.

#### Rilevanza clinica

Studi clinici ed incrociati hanno stabilito che la presenza di LAC costituisce un fattore di rischio per trombosi arteriose e venose.

La prevalenza di pazienti con trombosi è stata retrospettivamente associata ad anticorpi anticardiolipina e relativo dRVVT piuttosto che ad anticorpi antiprotrombina e relativo KCT in 25 pazienti con inibitori di coagulazione fosfolipide-dipendenti.

Perciò, la possibilità di distinguere il rischio trombotico di un paziente sulla base del profilo di coagulazione appare clinicamente rilevante. Deve essere posta molta attenzione quando si estrapolano questi dati dalla pratica clinica quotidiana, perché i reagenti e le tecniche usati nel KCT e nel dRVVT possono influenzare molto il valore predittivo dei profili di coagulazione.

Non è ancora chiaro se gli anticorpi antiprotrombina aumentino il rischio di eventi tromboembolici. Horbach et al. (25) studiarono una grande popolazione di pazienti con Lupus Erythematosus Sistemico, dimostrando che anticorpi antiprotrombina IgG e IgM (misurati con metodo ELISA) erano fattori di rischio per trombosi venosa (odds ratio=rischio relativo, 2.53 e 2.72; 95% intervalli di fiducia, 1.1 a 5.81 e 1.09 a 6.79 per IgG IgM rispettivamente) ma non per trombosi arteriosa.

In diverse analisi gli anticorpi antiprotrombina non riuscirono ad aumentare il rischio di trombosi venosa. L'associazione tra anticorpi antiprotrombina e trombosi in pazienti con Lupus Erythematosus Sistemico è stata confermata da uno studio retrospettivo svolto da Funke et al.

La natura retrospettiva di questi studi previene dal trarre conclusioni definitive. Perciò diversi studi clinici, incrociati e prospettici, sono portati avanti per stabilire l'attinenza clinica degli anticorpi antiprotrombina.

# I cofattori proteici

#### L'annessina V

L'annessina V (figg. 14-15) è una proteina placentare che si ritrova in debole quantità nel plasma. In vitro essa esercita una potente attività anticoagulante ma le sue funzioni fisiologiche non sono ancora conosciute. Alcuni studi hanno descritto la presenza di anticorpi anti-annessina V in pazienti che presentavano eventi clinici evocatori di una APS, trombosi e/o perdite fetali (26)(27).



Figura 14. Annessina V.

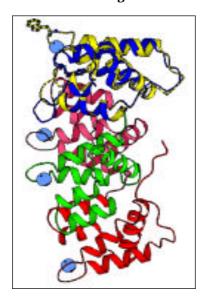


Figura 15. Struttura wildtype dell'annessi na V (vista laterale: sopra l'asse centrale). I quattro domini sono rappresentati in colori diversi: il dominio I in rosso, il dominio II in giallo, il dominio III in blu ed il dominio IV in verde. Gli atomi di calcio sono mostrati come sfere blu sul lato convesso della molecola.

L'annessina V in presenza di ioni calcio forma una struttura cristallina bidimensionale sulla superficie fosfolipidica. In tal modo riesce a dislocare i fattori della coagulazione ed esercita anche un ruolo di protezione dei meccanismi di apoptosi. Gli aPL in presenza di  $\,_2$ GPI sono risultati in grado di dislocare l'annessina V dalla superficie fosfolipidica, rendendola, pertanto, nuovamente disponibile per i fattori della coagulazione  $^{(28)}$ . Inoltre alcuni aPLche reagiscono con l'annessina V inducono apoptosi delle cellule endoteliali  $^{(29)}$ .

# La proteina C attivata

Il sistema della proteina C è uno dei principali sistemi di controllo della coagulazione del sangue.

Difetti qualitativi e/o quantitativi della proteina C e del suo cofattore, la proteina S, sono associati ad aumentato rischio di trombosi venose ed embolie polmonari.

Gli aPL sono in grado di inibire l'inattivazione del fattore V attivato da parte della proteina C attivata (aPC) su una superficie fosfolipidica (figura 16).

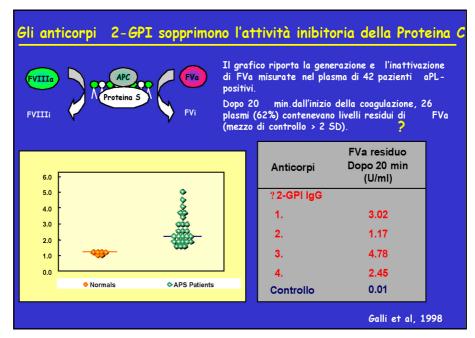


Figura 16. Soppressione dell'attività inibitoria della Proteina C.

Il termine "resistenza acquisita" all'aPC identifica questa condizione, che potrebbe spiegare, almeno in parte, l'aumentato rischio di trombosi venose dei pazienti con aPL.

La proteina C (PC), glicoproteina di 62.000 Da, composta da una catena leggera ed una pesante, è uno zimogeno di serino-proteasi la cui sintesi è vitamina K-dipendente (concentrazione ematica 4µg/ml). Per svolgere la sua azione inibitoria la proteina C deve essere attivata. In forma attivata la proteina C (APC) è una serino-proteasi ed esercita le sue proprietà anticoagulanti distruggendo proteoliticamente i fattori V e VIII della coagulazione; i fattori attivati (Va e VIIIa) vengono distrutti più rapidamente dei pro-fattori inattivi. L'unico attivatore fisiologico della proteina C è la trombina. Quest'ultima attiva la proteina C soltanto dopo essersi legata ad un cofattore proteico associato alla membrana plasmatica delle cellule endoteliali, la trombomodulina, glicoproteina trans-membrana (75-100.000 Da). Il legame della trombina con la trombomodulina determina un cambiamento conformazionale della trombina stessa tale che l'enzima non è più in grado di svolgere la sua attività pro-coagulante. Questi cambiamenti molecolari, infatti, le fanno perdere la capacità di attivare i fattori V, VIII e XIII della coagulazione, di interagire con la superficie piastrinica, formando il complesso pro-trombinasico e di trasformare il fibrinogeno in fibrina.

L'APC ha una duplice azione: infatti, oltre ad inattivare i fattori Va e VIIIa,

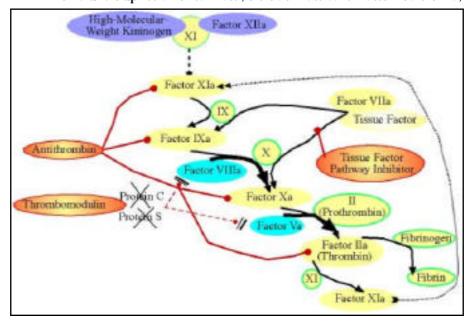


Figura 17. Deficit di proteina C e di proteina S.

stimola la fibrinolisi, agendo sugli inibitori della fibrinolisi. In particolare l'APC protegge l'attivatore tessutale del plasminogeno (t-PA) dall'inibizione da parte del suo inibitore, il PAI (plasminogen activator inhibitor). L'APC, quindi, è in questo caso un inibitore di un inibitore.

## La proteina S

L'azione della proteina C è potenziata dall'interazione con un'altra proteina, la cui sintesi è vitamina K-dipendente, la proteina S.

Questa proteina plasmatica non è una serino-proteasi e, oltre che dal fegato, può essere sintetizzata in piccole quantità anche dalle cellule endoteliali e dai megacariociti midollari. Essa agisce come cofattore nell'attività anticoagulante della proteina C. La proteina S ha un'alta affinità con i fosfolipidi (in virtù dell'abbondanza di acido gammacarbossiglutammico), in presenza di ioni calcio, favorendo quindi l'interazione fra APC e superfici cellulari. Il complesso APC-proteina S degrada specificamente ed estensivamente i fattori Va e VIIIa legati ai fosfolipidi sulle membrane delle cellule endoteliali e delle piastrine.

# La trombomodulina L'attivatore tissutale del plasminogeno

Gli aPL e la 2GPI possono interferire anche con la via fibrinolitica attraverso la trombomodulina, attivando l'inibitore della fibrinolisi trombina-inducibile e aumentando l'attività dell'inibitore I dell'attivatore del plasminogeno.

Questi risultati suggeriscono che l'interferenza degli aPL sull'attività fibrinolitica può essere una delle cause di diatesi trombofilica nell'APS.

L'attivatore tessutale del plasminogeno (tPA) è sintetizzato e secreto dalle cellule endoteliali in forma di catena singola. La concentrazione plasmatica di base è di 5-10 ng/ml. La forza di trascinamento (shear stress) esercitata dallo scorrimento del sangue sul rivestimento endoteliale vascolare sembra essere il più importante stimolo alla sua produzione (aumenta in condizioni di stress e dopo lo sforzo fisico).

Il suo p.m. è di 70.000 Da.

La forma a singola catena è convertita nella forma attiva a due catene: catena A (regione NH<sub>2</sub>-terminale) e catena B (regione COOH-terminale), contenente il sito catalitico.



Il tPA presenta alta affinità per la fibrina. Infatti, sulla fibrina esiste un sito di legame (figura 18) per particolari strutture ad "ansa" presenti nella catena A del tPA (attività fibrinolitica localizzata a livello del coagulo di fibrina).

Il tPA, oltre ad interagire con la fibrina, è in grado di legarsi anche a specifici siti di legame presenti sulla superficie delle cellule, annexin II. Esiste quindi anche un'attivazione del plasminogeno da parte del t-PA associato alle cellule. Questi "binding sites" sono stati trovati sulla superficie delle cellule endoteliali, che sono quindi in grado di "concentrare" la formazione di plasmina a livello del coagulo presente sulla superficie del vaso leso.

E' stato dimostrato anche che le piastrine sono in grado di legare il plasminogeno e questo plasminogeno legato alla cellula è molto più suscettibile all'attivazione da parte del tPA: le piastrine rappresentano una superficie idonea per l'attivazione del plasminogeno a livello del coagulo, dove sono imbrigliate.

# Il fattore XII Il chininogeno ad alto e basso P.M.

Studi più recenti riportano la presenza di anticorpi diretti verso il fattore XII in un numero significativo di pazienti con APS e suggeriscono che questa presenza possa determinare un deficit acquisito di fattore XII.

Il fattore XII della coagulazione, precallicreina, e il chininogeno ad alto peso molecolare sono noti come proteine plasmatiche di contatto nella via intrinseca della coagulazione. Deficit di queste proteine non sono associate a sanguinamento clinicamente evidente, nonostante un marcato prolungamen-

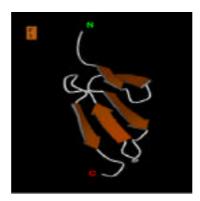


Figura 18. tPA-Fn1 Struttura del dominio del legame del tPA alla fibrina.

to del tempo di coagulazione surface-activated in vitro. Paradossalmente alcuni studi suggeriscono che queste proteine abbiano funzioni anticoagulanti e pro-fibrinolitiche. Infatti, un loro deficit è stato associato a trombosi ricorrenti. Inoltre alcuni studi riportano la presenza di autoanticorpi verso le proteine di contatto in pazienti con LES, trombosi e perdite fetali ricorrenti. Questi autoanticorpi sono spesso in associazione con gli aPL ed il Lupus Anticoagulant.

# Le lipoproteine a bassa densità ossidate

Sicuramente la modificazione ossidativa di LDL *in vivo* occupa un ruolo centrale nell'aterogenesi. E' stato dimostrato come anticorpi diretti contro gli epitopi di LDL ossidato (oxLDL) riconoscano i prodotti delle lesioni aterosclerotiche ma non quelli delle arterie normali, ma anche che i maggiori epitopi antigenici sono indotti nell'apolipoproteina B (apoB) durante la modificazione ossidativa di LDL.

Vaarala et al. (1993) dimostrarono che gli aCLtrovati in pazienti affetti da LES crossreagivano con oxLDL. Fu poi dimostrata l'interazione tra lipoproteine ossidate del plasma,  $_2$ GPI ed anticorpi anti- $_2$ GPI.

<sub>2</sub>GPI specificamente lega oxVLDL, oxLDL, o oxHDL. Anticorpi autoimmuni anti- <sub>2</sub>GPI di conseguenza si legano alla <sub>2</sub>GPI complessata con le lipoproteine ossidate.

Il legame di oxLDL ai macrofagi viene inibito dalla produzione di 2GPI esogena. E' interessante notare come il legame venga significativamente aumentato dal simultaneo incremento di 2GPI e di anticorpi anti-2GPI (30).

Inoltre è stato dimostrato durante studi sull'APS che oxLDL<sup>(31)</sup>, ma non LDL nativo, aggrava le manifestazioni cliniche. Più recentemente, George et al.<sup>(32)</sup> descrivono l'abbondante presenza di <sub>2</sub>GPI umana nelle placche aterosclerotiche umane, la sua associazione con cellule endoteliali e macrofagi e la sua colocalizzazione con linfociti CD4.

Queste scoperte sono fortemente suggestive del fatto che l'oxLDLè il bersaglio sequenziale non solo dell'anticorpo che reagisce direttamente con i fosfolipidi a carica negativa ma anche dell'anticorpo anti- 2GPI dopo che questo ha legato la 2GPI. Di conseguenza, il coinvolgimento di questa immunoreazione può esplicarsi non solo nel metabolismo delle lipoproteine ossidate del plasma ma anche negli eventi aterosclerotici dell'APS.

# La diagnosi di Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi:

## Le linee guida

La diagnosi di APS si basa fondamentalmente su parametri clinici e laboratoristici. La tabella seguente riassume le linee guida diagnostiche internazionali (tabella 8).

#### ITER DIAGNOSTICO DELLA APS: UNO O PIU' MANIFESTAZIONI CLINICHE E UNA O PIU' POSITIVITA' NEI TESTS DI LABORATORIO

#### **CRITERI CLINICI**

<u>Trombosi vascolari</u>: uno o più episodi di trombosi arteriose, venose o dei piccoli vasi, in qualsiasi organo o tessuto, confermate da tecniche di imaging, doppler o dall' istopatologia.

#### Patologia ostetrica:

- a) Una o più morti di feti normoconformati prima o oltre la 10<sup>^</sup> settimana di gravidanza;
- b) Uno o più morti premature di feti normoconformati prima della 34<sup>^</sup> settimana di gestazione, accompagnati da preeclampsia o eclampsia o severa insufficienza placentare;
- c) Tre o più aborti consecutivi non giustificabili da altre cause note prima o alla 10^ settimana di gestazione in assenza di anomalie anatomiche o ormonali materne o paterne ed avendo escluso cause cromosomiche materne.

#### CRITERI DI LABORATORIO

<u>Positività persistente per aCL</u> di classe IgG e/o IgM a titolo medio-alto, misurati con metodiche ELISA standardizzata in due o più occasioni ad almeno 8 settimane di intervallo.

<u>Positività persistente per Lupus Anticoagulant</u> rilevato secondo le linee guida suggerite dalla International Society on Thrombosis and Hemostasis Sottocomitato del Lupus Anticoagulant/phospholipid-dependent Antibodies, consistente nei seguenti passaggi:

- a) Prolungamento di un test di coagulazione dipendente dai fosfolipidi (KCT, aPTT, DRVVT, ecc.);
- b) Mancata correzione con mixing di plasma normale;
- c) Correzione ottenuta con aggiunta di fosfolipidi;
  - d) Esclusione di altre coagulopatie (es. inib. del FVIII, eparina, etc.).

Tabella 8. Linee guida diagnostiche internazionali.

La diagnosi muove dal dato clinico, ma deve essere supportata dalla positività persistente per anticorpi antifosfolipidi (aPL).

La APS rappresenta l'esempio di una patologia la cui diagnosi non può essere raggiunta se non con la partecipazione attiva sia del Laboratorio sia della Clinica (figura 19).

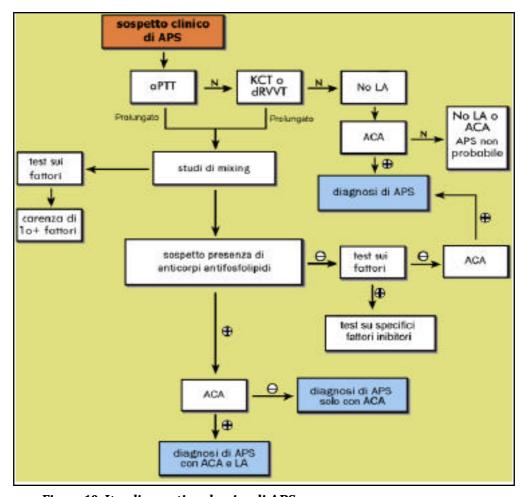


Figura 19. Iter diagnostico classico di APS.

# Test di screening

I test di laboratorio, data l'eterogeneità degli anticorpi antifosfolipidi, includono sia i test coagulativi per la diagnosi del LA sia i test immunoenzimatici per gli aCL.

#### Diagnosi di Lupus Anticoagulant

Le linee guida stabilite dal Sottocomitato Scientifico per la Standardizzazione (SSC) dell'International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) prevedono l'utilizzo di 2 o 3 tests coagulativi fosfolipide-dipendenti basati su diversi principi, uno dei quali, cioè, abbia una bassa concentrazione di fosfolipidi (figura 20).

Il test più usato per ragioni storiche e di praticità è il tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT).

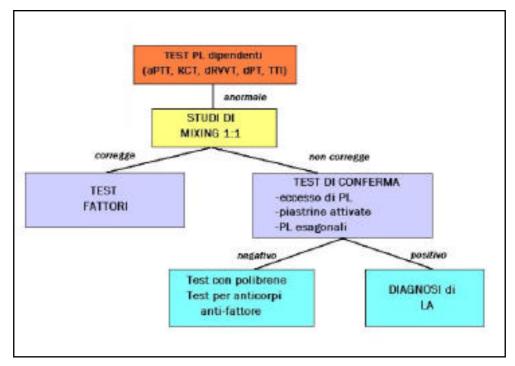


Figura 20. Diagnosi di Lupus Anticoagulant.

Tuttavia, nonostante la sua popolarità l'APTT non è in generale idoneo allo screening dei pazienti con sospetto di LA, a causa della scarsa sensibilità, che dipende essenzialmente dal tipo e dalla concentrazione dei fosfolipidi.

Tests più sensibili sono il tempo di coagulazione al caolino (KCT) e il test al veleno di Vipera Russell diluito (dRVVT).

Il KCT è un test globale della coagulazione che ha dimostrato un'elevata sensibilità, dovuta probabilmente al fatto che nella sua formulazione i fosfolipidi sono (quasi) assenti, rendendo la presenza del LA molto più evidente anche quando esso è presente a basso titolo. Gli svantaggi del KCT sono la necessità di eseguirlo con tecnica manuale, i tempi di coagulazione piuttosto lunghi e la variabilità dei risultati che impongono una rigida standardizzazione ed una accurata definizione del range di normalità.

Il dRVVT è anch'esso un test globale, dipendente dai fosfolipidi, che esplora la cascata coagulatoria a valle del fattore X attivato. La sua semplicità di esecuzione e la buona sensibilità ne hanno favorito la rapida diffusione nei laboratori.

Altri tests utilizzati sono: il tempo di protrombina diluito (**dPT**) ed il tempo di inibizione della tromboplastina tissutale (**TTI**)

Di fronte ad un test coagulativo alterato si deve procedere con **studi di mixing**: questo test si esegue con uno qualunque dei tests di screening precedentemente esaminati e consiste nella ripetizione del test su una miscela plasma paziente/plasma normale.

La persistenza del prolungamento del tempo di coagulazione eseguito nella miscela (mancata correzione), suggerisce la presenza di un anticoagulante circolante: si deve dimostrare se questo inibitore è effettivamente diretto contro i fosfolipidi.

Il rapporto tra il dVVRT test e il mixing test con plasma normale viene espresso in ratio.

Si esegue pertanto un **test di conferma** che consiste nella dimostrazione che l'aggiunta di fosfolipidi è in grado di correggere il tempo di coagulazione prima prolungato: la normalizzazione del test viene eseguito mediante aggiunta di fosfolipidi in eccesso o mediante la tecnica di neutralizzazione con piastrine attivate dal congelamento/scongelamento oppure mediante l'uso di fosfolipidi in fase esagonale.

Se il test di conferma risulta negativo potrebbe esserci eparina nel plasma, oppure si potrebbe formulare l'ipotesi di una coagulopatia dovuta alla presenza di inibitori specifici contro un fattore come gli anticorpi anti-FVIII.

# Test di conferma diagnosi APS

## Anticorpi anticardiolipina (aCA)

Il test degli anticorpi anticardiolipina è stato descritto nel 1983 come metodo radioimmunologico ma è stato rapidamente trasformato in metodo immunoenzimatico (ELISA) e come tale è oggi eseguito nel mondo. Il mezzo di cattura è rappresentato da una miscela costante e standardizzata di fosfolipidi anionici (acido fosfatidico, fosfatidilserina, cardiolipina) in presenza di cofattore plasmatico ( <sub>2</sub>GPI).

I kit ELISA sono indicati per la determinazione quantitativa di anticorpi diretti verso la cardiolipina delle classi IgG, IgM e talora IgAin siero umano e la positività viene espressa in unità GPL o MPL. Il test ELISAper anticorpi anti-cardiolipina rileva la presenza di Ab che legano la fase solida rivestita di cardiolipina. E' un test affidabile e di facile esecuzione.

I sottotipi vengono anch'essi saggiati con metodo ELISA in fase solida, che perciò rappresenta il test più adatto per svelare sia gli anticorpi anticardiolipina che gli altri sottotipi.

#### Anticorpi antifosfolipidi (aFL)

Gli aPL hanno assunto un ruolo importante nella diagnostica di laboratorio in questi ultimi anni. Appartengono, in ordine di frequenza, alle classi IgG, IgM e IgA. La ricerca degli anticorpi IgG e IgM su siero viene eseguita con test immunoenzimatici quantitativi. La micropiastra è ricoperta con una miscela altamente purificata di fosfolipidi carichi negativamente (cardiolipina, fosfatidilinositolo, fosfatidilserina e acido fosfatidico). Siccome gli anticorpi antifosfolipidi richiedono il cofattore 2GPI per legarsi, la micropiastra è saturata con 2GPI.

Il legame tra gli autoanticorpi eventualmente presenti forma un complesso "sandwich": tali anticorpi sono immobilizzati sulla parete dei pozzetti e vengono riconosciuti da un antisiero anti IgM o IgG umano coniugato con perossidasi che, in presenza del substrato cromogenico contenente tetrametilbenzidina (TMB), dà luogo alla formazione di un prodotto di idrolisi. L'intensità cromatica è direttamente proporzionale alla concentrazione di IgG o IgM presenti nella soluzione contenente il campione in esame. Tale intensità cromatica viene rilevata quantitativamente con la lettura spettrofotometrica a lunghezza d'onda di 450 nm.

## Anticorpi anti- 2GPI

Il rilevamento di questi anticorpi riveste oggi un significato diagnostico più specifico e sensibile del test degli aCL o aPL.

Il dosaggio degli anticorpi anti- <code>2</code>GPI di classe IgG/IgM viene eseguito su siero con test immunoenzimatici quantitativi. Gli Ab anti- <code>2</code>GPI di classe IgG e di classe IgM eventualmente presenti nel siero in esame vengono fissati mediante una reazione Ag-Ab sulla fase solida sensibilizzata con <code>2</code>GPI umana altamente purificata. Tali anticorpi così immobilizzati sulla parete dei pozzetti vengono riconosciuti da un antisiero anti IgM o anti IgG umano coniugato con perossidasi che in presenza di un opportuno substrato, il TMB (tetrametilbenzidina), dà luogo alla formazione di un prodotto d'idrolisi colorato.

L'intensità del colore così ottenuto risulta essere direttamente proporzionale al livello di Ab anti- <sub>2</sub>GPI presenti nel siero e viene quantizzata con la lettura spettrofotometrica a lunghezza d'onda 450 nm.

# Considerazioni conclusive

Nell'ambito della diagnosi della Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi di natura autoimmune si sono recentemente resi disponibili metodi immunoenzimatici per la misurazione dei livelli degli anticorpi anti-fosfolipidi (cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositolo, fosfatidiletanolamina ecc.) e degli anti-cofattori proteici ( 2 glicoproteina I, protrombina, annessina V ecc).

La determinazione degli anticorpi anti-cardiolipina associata a quella degli anticorpi anti- 2GPI e degli anticorpi anti-protrombina può ampliare e rendere più accurata la capacità diagnostica del fenomeno Lupus Anticoagulant nel laboratorio emocoagulativo.

Fondamentalmente la diagnosi è formulata sui consueti criteri clinici e laboratoristici:

- una positività persistente per anti-cardiolipina e anti- 2GPI
- ❖ la presenza di una trombosi venosa e/o arteriosa documentata con esami clinici e strumentali e/o una storia di tre o più aborti o di pre-eclampsia precoce o severa,

ma l'attenzione dei medici verso la diagnostica specialistica orientata allo studio di questa patologia ha evidenziato che:

- 1. è opportuno utilizzare, oltre ai tradizionali, nuovi test di laboratorio i quali sono stati meglio standardizzati negli ultimi anni, grazie a studi che hanno coinvolto numerosi Centri Europei;
- 2. la diagnosi di APS viene presa in considerazione non più solo quando sono presenti le classiche manifestazioni cliniche (quali ad esempio la poliabortività o la trombosi), infatti la lista delle scoperte cliniche della Sindrome si sta allungando e si tende dunque ad associare a questa sindrome disturbi del sistema nervoso centrale diversi da ICTUS e TIA, manifestazioni epilettiche (in età pediatrica), emicrania, disturbi del comportamento;
- 3. l'iter diagnostico deve seguire le nuove linee guida in base alle quali si propongono prima gli anticorpi anti-cardiolipina, poi gli anticorpi anti-2GPI e successivamente gli anticorpi anti-protrombina, anti-annessina V, anti-fosfatidilserina, anti-fosfatidilinositolo, anti acido-fosfatidico.

Alla luce degli studi effettuati, anche presso il ns. laboratorio, ed in considerazione delle linee guida già esistenti pare opportuno ridisegnare un iter completo dei tests di laboratorio da eseguire in caso di sospetta Sindrome da Anticorpi Anti-Fosfolipidi (figura 21).

Di conseguenza i test di screening possono ritenersi completi solo se tengono in considerazione tutti gli isotipi e se gli anticorpi anticardiolipina vengono determinati in combinazione con gli anticorpi anti- 2GPI, costituendo così un pannello utile e decisivo nello studio di queste patologie.

Gli anticorpi anti-cardiolipina IgG/IgM sembrano costituire l'isotipo predominante, ma studi recenti<sup>(33)</sup> segnalano l'importanza dell'isotipo IgA nelle patologie trombotiche, dato importante che sarà oggetto di studi successivi.

Possiamo quindi affermare che sono di grande interesse gli anticorpi antifosfatidilserina IgG-IgM: la loro determinazione è utile se associata ai precedenti test nei pazienti con inspiegabili malattie tromboemboliche venose e/o arteriose e ricorrenti perdite fetali.

Quindi la presenza di anticorpi associati alla Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi rappresenta un fattore di rischio per la comparsa di trombosi venosa e arteriosa e di tutte quelle patologie a cui ora gli anticorpi sono associati, anche per i pazienti che non mostrano nessuno di questi sintomi clinici, quindi asintomatici.

La patologia cerebro-cardiovascolare, ad esempio, è ritenuta dall'OMS la prima causa di morte nel mondo moderno ed in Italia. Essa, infatti, è stata collocata al primo posto nella distribuzione percentuale della mortalità, ancor prima della patologia neoplastica.

Questo dato scientifico spiega pertanto la graduale e continua crescita dell'attenzione dei medici (clinici e del territorio) verso la diagnostica specialistica orientata allo studio di questa patologia, che risulta spesso invalidante e quindi ad alto costo sociale.

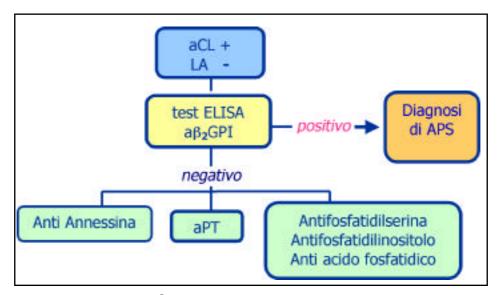


Figura 21. Nuovo iter diagnostico.

# **Bibliografia**

- Cervera R., Piette J.C., Font J., Khamastra M.A., Shoenfeld Y., Camps M.T., Jacobsen S., Lakos G., Tincani A., Kontopoulou-Griva I., Galeazzi M., Meroni P.L., Derksen rhmw, De Groot F., Gromnica- Ihle E., Baleva M., Bombardieri S., Houssiau F., Quere I., Gris J.C., Hachulla E., Vasconcelos C., Roch C., Fernandez-Nebro A., Boffa M.C, Hughes GRV and Ingelmo M. on behalf of the "euro- phospholipid project group": Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expressione in a cohort of 1,000 patients. Artritis Rheum 2002.
- 2. Girolami L., Scarano F., Vianello T.: Il rischio protrombotico: presupposti biochimici e fisiopatologici. Clinica Medica II, Dipartimento di scienze mediche e chirurgiche, Universita' degli Studi di Padova
- 3. James M. Provenzale, Daniel P. Barboriak, Nancy B. Allen, and Thomas L. Ortel: Antiphospholipid Antibodies: Findings at Arteriography. AJNR Am J Neuroradiol, April 1998.P19:611-616.
- 4. Branch D.W.: Thoughts on the mechanism of pregnancy loss associated with the antiphospholipid syndrome. Lupus 3:275,1994
- 5. Tincani, Allegri F., Sanmarco M., Cinquini M., Taglietti M., Balestrieri G., Koike T., Meroni P.L., Boffa M.C.: Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determiantions. Thromb Haemost 2001;86:576-583
- 6. Sugi T.,McIntyre J.A.: Autoantibodies to phosphatidilethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex: Blood 1995;86:3083-3089
- 7. McNeeley P.A., Victoria E.J., Marquis D., Crisologo J.F., Tuyay DC., Linnik M.D.: APS patient sera preferentially recognize the first domain of 2-glicoprotein I: Lupus 1998; 7:S176.
- 8. Rao L.V.M., Hoang A.D., Rappaport S.I., Forastiero et al Munoz-Rodriguez et al, Nojima et al.: Mechanism and effects of the binding of lupus anticoagulant IgG and prothrombin to surface phospholipids. Blood 1996; 88:4173-8.

- 9. McNeil H.P., Simpson R.J., Chesterman C.N., Krilis S.A.: Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding inhibitor of coagulation: 2glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87:4120-4124.
- 10. Schousboe J. et al.: 2-glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. Blood 1985; 66:1085-9.
- 11. McNeeley P.A., Victoria E.J., Marquis D., Crisologo J.F., Tuyay D.C., Linnik M.D.: APS patient sera preferentially recognize the first domain of 2-glicoprotein I. Lupus 1998; 7:S176.
- 12. Rao L.V.M., Hoang A.D., Rappaport S.I., Forastiero et al Munoz-Rodriguez et al, Nojima et al.: Mechanism and effects of the binding of lupus anticoagulant IgG and prothrombin to surface phospholipids. Blood 1996; 88:4173-8.
- 13. Cinquini M., Vianelli M., Allegri F., Cattaneo R., Balestrieri G., Tincani A.: Role of anti-prothrombin in antiphospholipid syndrome. Servizio di Reumatologia, Allergologia ed Immunologia clinica, Spedali Civili di Brescia.
- 14. Monica Galli and Tiziano Barbui: Antiprothrombin Antibodies: Detection and Clinical Significance in the Antiphospholipid Syndrome. Divisione di Ematologia, Ospedali Riuniti, Bergamo, Italy.
- 15. Bajaj S.P., Rapaport S.I., Barclav S., Herbst K.D.: Acquired hypoprothrombinemia due to nonneutralizing antibodies to prothrombin: mechanism and management. Blood 65:1538, 1985
- 16. Malia R.G., Brooksfield C., Bulman L., Greaves M.: Prothrombin fragment F 1-2: The epitope for antiphospholipid antibody expression. XVIth Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, Florence, Italy, June 6-12, 1997. Thromb Haemost 171, 1997 (abstr 689, suppl)
- 17. Puurunen M., Manttari M., Manninen V., Palosuo T., Vaarala O.: Antibodies to prothrombin crossreact with plasminogen in patients developing myocardial infarction. Haematol 100:374, 1998
- 18. Puurunen M., Palosuo T., Vaarala O.: Cross-reactivity of humoral and cel-

- lular immunity to plasminogen and prothrombin. Lupus 7:S209, 1998 (abstr B27, suppl 2)
- 19. Fleck R.A., Rapaport S.I., Rao L.V.M.: Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. Blood 72:512, 1988
- 20. Horbach D.A., van Oort E., Derksen RHWM, de Groot P.G.: The contribution of anti-prothrombin antibodies to lupus anticoagulant activity. Thromb Haemost 79:790, 1998
- 21. Rauch J., Tannenbaum M., Janoff A.S.: Distinguishing plasma lupus anticoagulants from anti-factor antibodies using hexagonal (II) phase phospholipids. Thromb Haemost 62:892, 1989
- 22. Rauch J., Janoff A.S.: Phospholipid in the hexagonal II phase is immunogenic: Evidence for immunorecognition of nonbilayer lipid phases in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 87:4112, 1990
- 23. Bajaj S.P., Rapaport S.I., Barclav S., Herbst K.D.: Acquired hypoprothrombinemia due to nonneutralizing antibodies to prothrombin: mechanism and management. Blood 65:1538, 1985
- 24. Horbach D.A., van Oort E., Donders RCJM, Derksen RHWM, de Groot P.G.: Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. Thromb Haemost 76:916, 1996
- 25. Horbach D.A., van Oort E., Derksen RHWM, de Groot Ph G.: Anti-prothrombin antibodies with LAC-activity inhibit tenase, prothrombinase and protein C activity by increasing the affinity of prothrombin to phospholipids. Lupus 7:S208, 1998 (abstr B22, suppl 2)
- 26. Matsuda J., Goth M., Saitoh N., Gohchi K., Tsukamoto W., Yamamoto T.: Anti-annexin V antibody in the sera of patients habitual fetal loss of preeclampsia. Thromb Res 1994, 75, 105-106.
- 27. Siaka C., Lambert M., Caron C., Amiral J., Hachulla E. et al.: Faible prévalence des anticorps anti-annexine V dans la syndrome des antiphospholipides avec pertes foetales. Rev Med interne 1999; 20 :762-5.
- 28. Rand J.H., Wu X.X., Giesen P.: A possible solution to the paradox of the "lupus" anticoagulant":antiphospholipides antibodies accelerate throm-

- bin  $\,$  generation by inhibiting annex in V. Thromb Haemost 1999;82:1370-1377  $\,$
- 29. Rand J.H.: Molecular pathogenesis of the antiphospholipid Syndrome. Circ Res 2002;90:29-37.
- 30. Hasunuma Y., Matsuura E., Makita Z., Katahira T., Nishi S., Koike T.: Involvement of 2 glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. Clin. Exp. Immunol. 1997;107:569-573.
- 31. George J., Blank M., Hojnik M., Bar-Meir E., Koike T. et al.: Oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) but not LDL aggravates the manifestations of experimental antiphospholipid syndrome (APS). Clin. Exp. Immunol.1997;108:227-223.
- 32. George J., Harats D., Gilburd B., Afek A., Levy Y., Schneiderman J.: Immunolocalization of 2-glycoprotein I (apolipoprotein I) to human atherosclerotic plaques: potential implications for lesion progression. Circulation 1999;99:2227-2230.
- 33. Sabatini L.: Fattori acquisiti di rischio trombotico. Annual Bouty Orgentec Immunology Symposium: Mainz 2004

# **Indice**

Editorialepag.	3
Introduzione»	5
APS: forme primarie e secondarie	6
Manifestazioni cliniche	8
Aspetti eziopatogenetici» 1	.5
I fosfolipidi	20
Gli aPL "convenzionali":» 2	23
il Lupus Anticoagulant (LAC)» 2	23
gli anticorpi anticardiolipina (aCL)	24
gli anticorpi antifosfatidiletanolamina (aPE)» 2	6
gli anticorpi antifosfatidilserina (aPS) » 2	27
gli anticorpi antifosfatidilinositolo (aPI)» 2	27
gli anticorpi anti acido fosfatidico (aPA) » 2	27
la beta 2 glicoproteina 1	28
La protrombina» 3	3
I cofattori proteici» 4	2
L'annessina V	2
La proteina C attivata	3
La proteina S» 4	5
La trombomodulina» 4	15
L'attivatore tissutale del plasminogeno	15
Il fattore XII» 4	16
Il chininogeno ad alto e basso P.M	6
Le lipoproteine a bassa densità ossidate» 4	17

La diagnosi di Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi» 48	
Le linee guida» 48	
Test di screening» 50	
Test di conferma diagnosi APS» 52	
Considerazioni conclusive» 54	
Bibliografia	
Indica "60	

# Caleidos copio

# ...il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SPA

- 1. Rassu S.: Principi generali di endocrinologia. Gennaio '83
- 2. Rassu S.: L'ipotalamo endocrino. Giugno '83
- 3. Rassu S.: L'ipofisi. Dicembre '83
- 4. Alagna., Masala A.: La prolattina. Aprile '84
- 5. Rassu S.: Il pancreas endocrino. Giugno '84
- 6. Fiorini I., Nardini A.: Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza). Luglio '84.
- 7. Rassu S.: L'obesita'. Settembre '84
- 8. Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.: Aspetti morfofunzionali dell'ovaio. Novembre '84.
- 9. Kubasik N.P.: Il dosaggio radioimmunologico (1). Dicembre '84.
- 10. Kubasik N.P.: Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima. Gennaio'85.
- 11. Kubasik N.P.: Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda. Febbraio '85.
- 12. Kubasik N.P.: Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima. Aprile '85.
- 13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: Il TSH. Giugno '85.
- 14. Facchinetti F. e Petraglia F.: La -endorfina plasmatica e liquorale. Agosto '85.
- 15. Baccini C.: Le droghe d'abuso (1). Ottobre '85.
- 16. Kubasik N.P.: Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda. Dicembre '85.
- 17. Nuti R.: Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale. Febbraio '86
- 18. Cavallaro E.: Ipnosi: una introduzione psicofisiologica. Marzo '86.
- 19. Fanetti G.: AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti. Maggio '86.
- 20. Fiorini I., Nardini A.: Toxoplasmosi, immunologia e clinica. Luglio '86.
- 21. Limone P.: Il feocromocitoma. Settembre '86.
- 22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici. Novembre '86.
- 23. Bolcato A.: Allergia. Gennaio '87.
- 24. Kubasik N.P.: Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico. Febbraio '87.
- 25. Carani C.: Patologie sessuali endocrino-metaboliche. Marzo '87.
- 26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: Le banche dati in medicina. Maggio '87.
- 27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: L'amenorrea. Giugno '87.
- 28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: Il paziente terminale. Luglio '87.
- 29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
- 30. Cingolani M.: Manuale di ematologia e citologia ematologica. Novembre '87.
- 31. Kubasik N.P.: Ibridomi ed anticorpi monoclonali. Gennaio '88.
- 32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: Diagnostica del carcinoma mammario. Febbraio '88.
- 33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: Neuroendocrinologia dello stress. Marzo '88.



- 34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: La fecondazione in vitro. Maggio '88.
- 35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: Il gozzo nodulare. Giugno '88.
- 36. Baccini C.: Le droghe d'abuso (2). Luglio '88.
- 37. Piantino P., Pecchio F.: Markers tumorali in gastroenterologia. Novembre '88.
- 38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: Le leucemie acute infantili. Gennaio '89.
- 39. Sommariva D., Branchi A.: Le dislipidemie. Febbraio '89.
- 40. Butturini U., Butturini A.: Aspetti medici delle radiazioni. Marzo '89.
- 41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: Diagnostica delle neoplasie colo-rettali. Aprile '89.
- 42. Palleschi G.: Biosensori in Medicina. Maggio '89.
- 43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: HTLV-I. Giugno '89.
- 44. Fanetti G.: Emostasi: fisiopatologia e diagnostica. Luglio '89.
- 45. Contu L., Arras M.: Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie. Settembre '89.
- 46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: Immunologia dell'occhio. Ottobre '89.
- 47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: Infezioni opportunistiche in corso di AIDS. Gennaio '90.
- 48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: La coriogonadotropina umana. Febbraio '90.
- Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: L'immunologia del diabete mellito. Marzo '90.
- 50. Cappi F.: La trasfusione di sangue: terapia a rischio. Aprile '90.
- 51. Tortoli E., Simonetti M.T.: I micobatteri. Maggio '90.
- 52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: Anticorpi antinucleo. Giugno '90.
- 53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: Le macchine in terapia intensiva. Luglio '90.
- 54. Goracci E., Goracci G.: Gli allergo-acari. Agosto '90.
- 55. Rizzetto M.: L'epatite non A non B (tipo C). Settembre '90.
- 56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: Infezione da HIV-1: patoge nesi ed allestimento di modelli animali. Ottobre '90.
- 57. La Vecchia C. Epidemiologia e prevenzione del cancro (I). Gennaio '91.
- 58. La Vecchia C. Epidemiologia e prevenzione del cancro (II). Febbraio '91.
- 59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: Le molecole dell'adesi vità nelle cellule immunocompetenti. Marzo '91.
- 60. Bedarida G., Lizioli A.: La neopterina nella pratica clinica. Aprile '91.
- 61. Romano L.: Valutazione dei kit immunochimici. Maggio '91.
- 62. Dondero F. e Lenzi A.: L'infertilità immunologica. Giugno '91.
- 63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: Gli Oncogèni. Luglio '91.
- 64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *In* fezione-malattia da HIV in Africa. Agosto '91.
- 65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni. Settembre '91.
- 66. Gentilomi G.A.: Sonde genetiche in microbiologia. Ottobre '91.
- 67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: Le sonde di DNA e la virulenza batterica. Gennaio '92.
- 68. Zilli A., Biondi T.: Il piede diabetico. Febbraio '92.
- 69. Rizzetto M.: L'epatite Delta. Marzo '92.
- 70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: Gli screening neonatali. Aprile '92.
- 71. Tavani A., La Vecchia C.: Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari. Luglio '92.
- 72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.



- 73. Contu L., Arras M.: Molecole di membrana e funzione immunologica (I). Settembre '92.
- 74. Ferrara S.: Manuale di laboratorio I. Ottobre '92.
- 75. Gori S.: Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti. Novembre '92.
- 76. Ferrara S.: Manuale di laboratorio II. Gennaio '93.
- 77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: Ipertensione Arteriosa. Febbraio '93.
- 78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: I linfomi non Hodgkin. Marzo '93.
- 79. Arras M., Contu L.: Molecole di membrana e funzione immunologica (II). Aprile '93.
- 80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: Terapia antiretrovirale. Maggio '93.
- 81. Rizzetto M.: L'epatite C. Settembre '93.
- 82. Andreoni S.: Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti. Ottobre '93.
- 83.Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: Diagnostica con radio nuclidi del Morbo di Graves-Basedow. Novembre '93.
- 84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: Chemiluminescenza. Dicembre '93.
- 85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: Applicazioni degli esami immunologici. Gennaio 94.
- 86. Arras M., Contu L.: Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B. Febbraio '94.
- 87. Rossetti R.: Gli streptoccocchi beta emolitici di gruppo B (SGB). Marzo '94.
- 88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: Marcatori biochimici del rimodel lamento osseo. Aprile '94.
- 89. Fanetti G.: Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare. Settembre '94.
- 90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario. Ottobre '94.
- 91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: Helicobacter pylori. Novembre '94.
- 92. Parazzini F.: L'epidemiologia della patologia ostetrica. Febbraio '95.
- 93. Proietti A., Lanzafame P.: Il virus di Epstein-Barr. Marzo '95.
- 94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: Im munoflogosi nell'asma bronchiale. Maggio '95.
- 95. Manduchi I.: Steroidi. Giugno '95.
- 96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale. Luglio '95.
- 97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani. Ottobre '95.
- 98.La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica. Dicembre '95.
- 99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: Diabete mellito e disfunzioni conoscitive. Gennaio '96.
- 100.Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma. Marzo '96.
- 101. Cogato I. Montanari E.: La Sclerosi Multipla. Aprile '96.
- 102.Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale.* Maggio '96.
- 103. Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.
- 104.Marcante R., Dalla Via L.: Il virus respiratorio sinciziale. Luglio '96.
- 105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tis sutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative. Ottobre '96.
- 106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale. Novembre '96.



- 107. Morganti R.: Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali. Dicembre '96.
- 108. Andreoni S.: Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti. Gennaio '97.
- 109. Salemi A., Zoni R.: Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi. Febbraio '97.
- 110.Meisner M.: Procalcitonina. Marzo '97.
- 111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: Malattie a trasmissione sessuale (2). Aprile '97.
- 112.Palleschi G. Moscone D., Compagnone D.: Biosensori elettrochimici in Biomedicina. Maggio '97.
- 113. Valtriani C., Hurle C.: Citofluorimetria a flusso. Giugno '97.
- 114.Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: Alcol e problemi correlati. Settembre '97.
- 115.Piccinelli M.: Depressione Maggiore Unipolare. Ottobre '97.
- 116.Pepe M., Di Gregorio A.: Le Tiroiditi. Novembre '97.
- 117. Cairo G.: La Ferritina. Dicembre '97.
- 118.Bartoli E.: Le glomerulonefriti acute. Gennaio '98.
- 119.Bufi C., Tracanna M.: Computerizzazione della gara di Laboratorio. Febbraio '98.
- 120. National Academy of Clinical Biochemistry: Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide. Marzo '98.
- 121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.: L'ansia. Aprile '98.
- 122.Cinco M.: La Borreliosi di Lyme. Maggio '98.
- 123. Giudice G.C.: Agopuntura Cinese. Giugno '98.
- 124.Baccini C.: Allucinogeni e nuove droghe (1). Luglio '98.
- 125.Rossi R.E., Monasterolo G.: Basofili. Settembre '98.
- 126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: *Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo 1*. Novembre '98.
- 127.Baccini C.: Allucinogeni e nuove droghe (11). Dicembre '98.
- 128. Muzi P., Bologna M.: Tecniche di immunoistochimica. Gennaio '99.
- 129.Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivi rali*. Febbraio '99.
- 130.Castello G., Silvestri I.: Il linfocita quale dosimetro biologico. Marzo '99.
- 131.AielloV., Caselli M., Chiamenti C.M.: Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori corre lata. Aprile '99.
- 132.Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: *Medicina Termale e Malattie Reumatiche*. Maggio '99.
- 133.Rossi R.E., Monasterolo G.: Eosinofili. Giugno '99.
- 134.Fusco A., Somma M.C.: NSE (Enolasi Neurono-Specifica). Luglio '99.
- 135. Chieffi O., Bonfirraro G., Fimiani R.: La menopausa. Settembre '99.
- 136.Giglio G., Aprea E., Romano A.: Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi. Ottobre
- 137. Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati. Novembre '99.
- 138. Giovanella L.: Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica. Dicembre '99.
- 139.Paladino M., Cerizza Tosoni T.: *Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management*. Gennaio 2000.
- 140.La Vecchia C.: Come evitare la malattia. Febbraio 2000.
- 141.Rossi R.E., Monasterolo G.: Cellule dendritiche. Marzo 2000.
- 142.Dammacco F.: Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I). Aprile 2000.



- 143.Dammacco F.: Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II). Maggio 2000.
- 144. Croce E., Olmi S.: Videolaparoscopia. Giugno 2000.
- 145.Martelli M., Ferraguti M.: Allergo Gest. Settembre 2000.
- 146. Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: TTP e sindromi correlate: nuovi oriz zonti diagnostici e terapeutici. Gennaio 2001.
- 147.Rassu S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: L'umanizzazione dei servizi sanitari. Febbraio 2001
- 148. Giovanella L.: I tumori della tiroide. Marzo 2001.
- 149.Dessì-Fulgheri P., Rappelli A.: L'ipertensione arteriosa. Aprile 2001.
- 150. The National Academy of Clinical Biochemistry: Linee guida di laboratorio per lo scree ning, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico. Settembre 2001.
- 151.Dominici R.: Riflessioni su Scienza ed Etica. Ottobre 2001.
- 152.Lenziardi M., Fiorini I.: Linee guida per le malattie della tiroide. Novembre 2001.
- 153. Fazii P.: Dermatofiti e dermatofitosi. Gennaio 2002.
- 154. Suriani R., Zanella D., Orso Giacone G., Ceretta M., Caruso M.: Le malattie infiamma torie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica. Febbraio 2002.
- 155. Trombetta C.: Il Varicocele. Marzo 2002.
- 156.Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: Ambiente e polmone. Aprile 2002.
- 157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: I Markers tumorali. Maggio 2002.
- 158. Loviselli A., Mariotti S.: La Sindrome da bassa T3. Giugno 2002.
- 159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giacone G.: *Helicobacter Pylori: stato dell'arte*. Ottobre 2002.
- 160. Canini S.: Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato. Novembre 2002.
- 161. Atzeni M.M., Masala A.: La -talassemia omozigote. Dicembre 2002.
- 162. Di Serio F.: Sindromi coronariche acute. Gennaio 2003.
- 163. Muzi P., Bologna M.: Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario. Febbraio 2003.
- 164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche. Marzo 2003.
- 165. Magrì G.: Aspetti biochimici e legali nell'abuso alcolico. Aprile 2003.
- 166. Rapporto dello Hastings Center: Gli scopi della medicina: nuove priorità. Maggio 2003.
- 167. Beelke M., Canovaro P., Ferrillo F.: Il sonno e le sue alterazioni. Giugno 2003.
- 168. Macchia V., Mariano A.: Marcatori tumorali nel cancro della vescica. Luglio 2003.
- 169. Miragliotta G., Barra Parisi G., De Sanctis A., Vinci E.: *La Turbercolosi Polmonare: Diagnostica di Laboratorio*. Agosto 2003.
- 170. Aebischer T.: Il Comitato Internazionale della Croce Rossa ed il Diritto Internazionale Umanitario. Settembre 2003.
- 171. Martino R., Frallicciardi A., Tortoriello R.: Il manuale della sicurezza. Ottobre 2003.
- 172. Canigiani S. e Volpini M.: *Infarto acuto del miocardio: biochimica del danno cellulare e marcatori di lesione.* Novembre 2003.
- 173. La Brocca A. Orso Giacone G. Zanella D. Ceretta M.: Laboratorio e clinica delle princi pali affezioni tiroidee. Dicembre 2003.
- 174. Savron G.: Le Fobie. Gennaio 2004.

- 175. Paganetto G.: Evoluzione storica del rischio di patologie umane per contaminazione chi mica ambientale. Febbraio 2004.
- 176. Giovanella L.: Iperparatiroidismo e tumori paratiroidei. Marzo 2004.
- 177. Severino G., Del Zompo M.: Farmacogenomica: realtà e prospettive per una "Medicina Personalizzata". Aprile 2004.
- 178 Arigliano P.L.: Strategie di prevenzione dell'allergia al lattice nelle strutture sanitarie. Maggio 2004.
- 179. Bruni A.: Malattia di Alzheimer e Demenza Frototemporale. Giugno 2004.
- 180. Perdelli F., Mazzarello G., Bassi A.M., Perfumo M., Dallera M.: Eziopatogenesi e diagnostica allergologica. Luglio 2004.
- 181. Franzoni E., Gualandi P. Pellegrini G.: *I disturbi del comportamento alimentare*. Agosto 2004.
- 182. Grandi G., Peyron F.: La toxoplasmosi congenita. Settembre 2004.
- 183. Rocca D.L., Repetto B., Marchese A., Debbia E.A: Patogeni emergenti e resistenze batte-riche. Ottobre 2004.
- 184. Tosello F., Marsano H.: Scientific English Handout. Novembre 2004.
- 185. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D.: *Ipertensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio*. Dicembre 2004.
- 186. Paganetto G.: Malattie Neoplastiche: dalla Paleopatologia alle Fonti Storiche. Gennaio 2005.
- 187. Savron G.: La sindrome dai mille tic: il disturbo di Gilles de la Tourette. Febbraio 2005.
- 188. Magrì G., Baghino E., Floridia M., Ghiara F.: Leishmania. Marzo 2005.
- 189. Lucca U., Forloni G., Tiraboschi P., Quadri P., Tettamanti M., PasinaL.: *Invecchiamen to, deterioramento cognitivo e malattia di Alzheimer*. Aprile 2005.
- 190. Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G.: Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili. Maggio 2005.
- 191. Mazzarello M.G., Albalustri G., Audisio M., Perfumo M., L. Cremonte G.: Aerobiologia ed allergopatie. Giugno 2005.
- 192. Scalabrino G., Veber D., Mutti E.:Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B12. Luglio 2005.
- 193. Zepponi E.: Guida pratica per gli utenti del laboratorio analisi. Settembre 2005.
- 194. Faricelli R., Esposito S., Martinotti S.: *La sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi*. Ottobre 2005.



I volumi disponibili su Internet nel sito www.medicalsystems.it sono riportati in nero mentre in grigio quelli non ancora disponibili su Internet.

Inoltre sono disponibili un limitato numero di copie di alcuni numeri del Caleidoscopio che ormai sono "storiche". Qualora mancassero per completare la collana potete farne richiesta al collaboratore Medical Systems della Vostra zona. I numeri sono: Caleidoscopio 14, 18, 33, 40, 48, 49, 50, 54, 65, 68, 84, 100, 106, 118, 121, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 134. I volumi verranno distribuiti sino ad esaurimento e non verranno ristampati se non in nuove edizioni.

## Caleidoscopio

Rivista mensile di Medicina anno 23. numero 194

**Direttore Responsabile** 

Sergio Rassu

Tel. mobile 338 2202502

E-mail: sergiorassu@libero.it

Responsabile Ufficio Acquisti

Giusi Cunietti

Servizio Abbonamenti Maria Grazia Papalia Flavio Damarciasi

Progettazione e Realizzazione



Restless Architect of Human Possibilities s.a.s.

Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Maria Speranza Giola Giovanna Nieddu

#### **EDITORE**



Via Rio Torbido, 40 16165 Genova (Italy) Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso); Telefax 010/8340310-809070.

Internet URL: http://www.medicalsystems.it La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Illustrato, Caleidoscopio Letterario, Giornale della Associazione per l'Automazione del Laboratorio, Guida Pratica Immulite<sup>®</sup>, Journal of Clinical Ligand Assay, Pandora, Tribuna Biologica e Medica.

#### Stampa

LA STAMPA - Industrie Grafiche S.p.A. Salita Pino Sottano, 3/C - Genova Tel. 010 8360167 - Fax 010 8367321

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996 Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa nº 2661 del 2 Settembre 1989 Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) nº 1188

> Finito di stampare: Ottobre 2005 Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

> Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da: "L'ECO DELLASTAMPA" Via Compagnoni, 28 - Milano