

**RICERCA:  
SCADENZA BANDO 28 NOVEMBRE 2009**

**Finanziamento di due progetti per la ricerca e cura del LES dell'importo di 30.000 euro**

*Progetto pubblicato su ICARO 60, Maggio 2010  
Relazione intermedia pubblicata su ICARO 63, Maggio 2011*

Prof. Pier Luigi Meroni  
Cattedra e Divisione di Reumatologia  
Università degli Studi di Milano  
Ist. G. Pini  
pierluigi.meroni@unimi.it

*Relazione conclusiva dello studio finanziato dal Gruppo LES:*

**Validazione di nuovi parametri biologici indicativi dell'interessamento del sistema nervoso centrale in pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico.**

**PREMESSA**

L'interessamento del sistema nervoso centrale in corso di lupus rappresenta un'evenienza relativamente frequente e di notevole impatto sulla prognosi della malattia e sulla qualità di vita dei pazienti e dei loro famigliari.

Sovente le manifestazioni cliniche del danno al sistema nervoso centrale sono subdole e di difficile diagnosi. Anche le tecniche più moderne (risonanza magnetica, PET, SPECT) non danno quadri diagnostici specifici. Altre indagini strumentali o test funzionali (ad esempio quelli neuropsicologici) non sono sensibili/specifici o non sono facilmente praticabili. Ciò nonostante vi è frequentemente la necessità urgente di suffragare un sospetto clinico.

Diversi sono i meccanismi responsabili di queste manifestazioni. Si ritiene che molto frequentemente un ruolo importante sia giocato da particolari autoanticorpi in grado di determinare un danno nel tessuto nervoso.

Il progetto finanziato dal Gruppo Italiano LES aveva come obiettivo la messa a punto di un test immunoenzimatico (ELISA) per l'identificazione di autoanticorpi in grado di reagire con il recettore NR2 espresso in cellule del tessuto nervoso centrale. Questo tipo di autoanticorpi è stato descritto recentemente come un potenziale meccanismo responsabile di alterazioni neurologiche funzionali in corso di LES. Tuttavia i dati riportati in letteratura sono contrastanti e non vi è una standardizzazione del metodo tale da consentirne un uso nella pratica comune.

**CONSUNTIVO DELLA RICERCA**

*Messa a punto delle metodiche per l'identificazione di anticorpi anti-NR2.*

Sono state messe a punto e paragonate due metodiche ELISA per la determinazione di anticorpi anti-NR2.

La prima utilizza piastre copulate con un peptide analogo a quello descritto nei lavori originali (decapeptide). Il peptide è stato sintetizzato dal nostro gruppo e la metodica è stata validata con quella pubblicata dal Dr R. Omdal (University of Bergen, Norway) (Eur J Neurol. 2005;12:392-8) in uno studio collaborativo.

La seconda metodica utilizza un peptide ramificato sintetizzato presso l'University of Oklahoma, USA, Dr J. Merrill (Hanly et al Arthritis Rheum. 2008; 58, 843-853). In collaborazione con il gruppo americano il test è stato messo a punto in uno studio che ha successiva-

mente coinvolto anche il Research Department of Immunopathology di INOVA (San Diego, USA). Dal peptide ramificato originale sono stati generati peptidi ciclici ed è stata utilizzata una metodica in chemiluminescenza.

Le metodiche sono state confrontate testando un pannello di sieri da pazienti con LES (n. 50) e con sindrome da anticorpi antifosfolipidi sia primitiva sia associata ad altre connettiviti sistemiche (n.80). Il cut off è stato calcolato utilizzando sieri da donatori sani di età e sesso sovrapponibile a quello dei pazienti (n. 96). Come ulteriore controllo sono stati testati sieri di pazienti con ipergammaglobulinemia policlonale, sieri con componenti monoclonali e sieri da pazienti con malattie infettive (n. 36), al fine di valutare la specificità del sistema.

La percentuale di sieri di LES positivi per anti-NR2 si è confermata intorno al 30 % con le diverse metodiche utilizzate. In generale il test che utilizza piastre copulate con il peptide ramificato presenta una sensibilità sovrapponibile a quello con il decapeptide ma una specificità nettamente migliore. Infatti la frequenza di risultati “falsamente” positivi nei campioni di controllo si riduceva drasticamente nei sistemi con il peptide ramificato.

Sempre nell’ottica di validare i test per l’individuazione degli anticorpi anti-NR2, abbiamo inoltre paragonato i test ELISA con due differenti metodiche che sono state recentemente utilizzate per la ricerca di questi autoanticorpi: a) immunofluorescenza indiretta su cellule HEK transfettate con NR1 & NR2 e b) immunofluorescenza indiretta su sezioni criostatiche di tessuto nervoso cerebrale di ratto. Queste due metodiche sono state eseguite in collaborazione con il Dipartimento di Neuroscienze U.O. di Neurologia, Ospedale Ca’ Foncello Azienda ULSS n.9 – Treviso (Prof. B. Giometto).

I due test in immunofluorescenza si sono rivelati poco sensibili e nessuno dei campioni positivi per anti-NR2 in ELISA si è riconfermato né sui vetrini di cellule HEK transfettate né nelle sezioni criostatiche.

La metodica in chemiluminescenza ha offerto risultati sovrapponibili a quelli ottenibili in ELISA, ma con una migliore sensibilità, riproducibilità e facilità di esecuzione (automatizzazione).

L’analisi dei dati sull’uso di peptidi ciclici richiede un’estensione dei tempi e sarà completata nei prossimi mesi.

*Correlazione tra la presenza degli autoanticorpi e la manifestazioni cliniche.*

Il numero relativamente piccolo di pazienti con LES studiati fino ad ora non ha permesso di trovare associazioni statisticamente significative tra la presenza di anti-NR2 e manifestazioni nervose centrali. La messa a punto della metodica in chemiluminescenza consentirà il completamento dell’analisi clinica nei prossimi mesi.

Collateralmente, utilizzando i due test ELISA, abbiamo documentato per la prima volta nel gruppo di campioni di siero da pazienti con sindrome da anticorpi antifosfolipidi primitiva un’incidenza di anti-NR2 sovrapponibile a quella documentabile in corso di LES.

Questo dato, in aggiunta alle alterazioni riscontrate ai test neuropsicologici nei pazienti con APS primitiva, rappresenta un risultato originale che migliora le nostre conoscenze sulla sindrome e sarà oggetto di pubblicazione (il lavoro è in fase di stesura).

Analogamente a quanto ritrovato nei pazienti con lupus, la positività per anti-NR2 nelle APS primitive non correla con l’alterazione dei test neuropsicologici, suggerendo un ruolo di altri mediatori nel danno cerebrale in aggiunta agli anticorpi anti-NR2.

## CONCLUSIONI

- Abbiamo raggiunto una standardizzazione del sistema ELISA con il peptide ramificato per l’individuazione di autoanticorpi anti-NR2.
- E’ stata messa a punto una nuova metodica in chemiluminescenza più vantaggiosa rispetto a quella tradizionale in ELISA.
- Sono stati prodotti nuovi peptidi ciclici, generati da quello ramificato originale, che sono in corso di valutazione/validazione.
- L’uso delle tecniche in immunofluorescenza indiretta su cellule HEK transfettate e su sezioni criostatiche di tessuto cerebrale di ratto non è risultato dare un significativo contributo

- all'identificazione di questi autoanticorpi.
- Titoli elevati di autoanticorpi anti-NR2 sono stati rinvenuti nei sieri di LES. Non possiamo confermare al momento l'associazione tra gli autoanticorpi e le manifestazioni cliniche, essendo relativamente limitata la casistica indagata.
  - Per la prima volta sono stati riportati livelli elevati di anticorpi anti-NR2 in pazienti con forme primitive di sindrome da anticorpi antifosfolipidi.
  - Le metodiche messe a punto possono ora essere applicate all'analisi dei campioni provenienti dalle Unità Operative dello studio per valutare eventuali associazioni cliniche.

Milano, 21/03/2012

*Prof. Pier Luigi Meroni  
Cattedra e Divisione di Reumatologia  
Università degli Studi di Milano  
Ist. G. Pini*

**RICERCA:  
SCADENZA BANDO 6 NOVEMBRE 2011**

**Finanziamento di due progetti biennali da € 25.000 ciascuno per la ricerca e cura del LES**

*Progetto pubblicato su ICARO 63, Maggio 2011*

Elda Favari, Ph.D.  
Department of Pharmacological and Biological Sciences  
and Applied Chemistries, University of Parma, Italy  
Faculty of Pharmacy, Parco Area delle Scienze 27/A  
43124 Parma  
Tel./Fax. +39 0521 905040  
elda.favari@unipr.it

Relazione intermedia sull'andamento del progetto di ricerca biennale intitolato:

***“Lupus Eritematoso Sistemico ed aterosclerosi accelerata:  
lipoproteine disfunzionali e proteina C reattiva, al crocevia tra  
infiammazione e dislipidemia, come possibili markers di rischio,  
mediatori di danno e targets terapeutici”.***

L'aterosclerosi e le relative complicanze cardiovascolari sono attualmente tra i principali problemi clinici dei pazienti affetti da LES. Tra i fattori in causa vi sono sia elementi comuni alla popolazione generale, come la dislipidemia, l'ipertensione, il fumo di sigaretta, ecc, ma anche elementi più specifici dei pazienti con malattie autoimmuni, come l'infiammazione. Tuttavia non sono tuttora chiariti nel dettaglio i meccanismi alla base dell'aterosclerosi accelerata nel LES. La loro migliore comprensione potrebbe aiutare a sviluppare terapie specifiche e mirate sulle reali necessità di questo gruppo di pazienti.

Lo scopo del progetto di ricerca in corso è di verificare l'ipotesi che le lipoproteine circolanti in soggetti con LES trasportino proteine infiammatorie e presentino caratteristiche funzionali alterate, che contribuiscano a spiegare l'aterosclerosi accelerata e offrano quindi nuovi spunti terapeutici.