

- 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.

In questo primo anno di lavoro sono stati raccolti campioni di siero da 30 pazienti con LES e sono state completate le analisi su alcuni parametri lipidici e di funzionalità delle lipoproteine ad alta densità (HDL). Sono inoltre in fase di esecuzione le indagini volte ad analizzare la composizione delle lipoproteine purificate da un sottogruppo di pazienti, con particolare riferimento a sostanze ad azione infiammatoria, come ad esempio la proteina C reattiva.

Le lipoproteine HDL, comunemente conosciute come trasportatrici del “colesterolo buono”, hanno azione protettiva nei confronti dell’aterosclerosi. Tuttavia studi recenti hanno dimostrato che non è solo la quantità in circolo ad essere importante, ma anche la loro composizione e la loro funzionalità. Una delle loro funzioni principali è quella di facilitare il processo attraverso il quale il colesterolo in eccesso viene rimosso dalle arterie e veicolato al fegato per la sua eliminazione con la bile. Questo processo inizia con la fuoriuscita del colesterolo dai macrofagi (le principali cellule coinvolte nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche), che viene favorita appunto dalle HDL in base alle loro proprietà attraverso alcuni sistemi di trasporto. Ogni singolo siero ha dunque una certa capacità di “estrarre” il colesterolo dai macrofagi, rappresentata dalla sigla CEC (capacità di efflusso del colesterolo). È stato dimostrato che la misurazione della CEC del siero umano fornisce una stima attendibile della funzionalità delle HDL e del grado di protezione cardiovascolare.

I risultati di questa prima fase di studio hanno dimostrato che nei pazienti affetti da LES la CEC è complessivamente ridotta, e non correla con le concentrazioni circolanti delle HDL. Questo significa che la sola misurazione delle HDL nel sangue non è rappresentativa del grado di ateroprotezione, a differenza della popolazione generale. Inoltre, le analisi dettagliate sui meccanismi cellulari attraverso i quali il colesterolo viene estratto dai macrofagi hanno dimostrato che nel LES vi è un disturbo funzionale delle HDL molto particolare, diverso da quello rilevato ad esempio in un gruppo di 30 pazienti affetti da Artrite Reumatoide. Risulta infatti molto compromessa la capacità delle HDL dei pazienti con LES di promuovere la CEC attraverso i trasportatori cellulari chiamati ABCG1 e ABCA1, ma non attraverso il trasportatore chiamato SR-BI. Poiché l’attivazione di tutti questi trasportatori è correlata con particolari funzioni del macrofago, che è una cellula del sistema immunitario e già attivata nel LES, il riscontro di anomalie di funzionamento delle HDL nell’interagire con tali molecole può avere interessanti implicazioni per la comprensione non solo dell’aterosclerosi accelerata, ma anche delle relazioni tra metabolismo del colesterolo e meccanismi autoimmuni nel LES.

I dati ottenuti infine sono molto importanti anche sul piano pratico perché:

- 1) indicano che non è, o non è soltanto, l’infiammazione che in modo aspecifico disturba la funzionalità delle HDL;
- 2) aiutano a valutare accuratamente il rischio cardiovascolare nei pazienti con LES e a mettere in atto le adeguate strategie preventive;
- 3) possono rappresentare la base per sviluppare terapie confezionate “su misura” per i pazienti con LES. Infatti, anche nella popolazione generale, l’abbassamento dei livelli ematici delle lipoproteine LDL, quelle che trasportano il “colesterolo cattivo”, attraverso dieta, integratori o farmaci come le statine, pur essendo un caposaldo della prevenzione e della terapia dell’aterosclerosi e delle sue complicanze, non si è rivelata sufficiente a garantire una totale protezione.

La seconda fase dello studio sarà dedicata alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell’alterato funzionamento delle HDL nei pazienti con LES, con analisi volte definire la loro composizione, trattandosi di complesse contenenti colesterolo, fosfolipidi e diverse proteine.

---

**RICERCA:  
SCADENZA BANDO 6 NOVEMBRE 2010**

---

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

Progetto pubblicato su ICARO 63, Maggio 2011

Dr. Nicola Bassi  
Policlinico Universitario di Padova,  
Dep. Di Medicina,  
Div. Di Rheumatology,  
via Giustiniani, 2  
35128 Padova,  
nicola.bassi@unipd.it

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

***Anticorpi anti-pentrassina 3 (PTX3) nella modulazione della glomerulonefrite nel modello murino di lupus NZB/NZWFI.  
Trattamento della glomerulonefrite in topi NZB/NZWFI***

**INTRODUZIONE**

La pentrassina 3 (PTX3) è stata osservata nel tessuto interstiziale renale dei pazienti glomerulonefrite lupica. Anticorpi anti-PTX3 sono stati recentemente descritti nel lupus eritematoso sistemico (LES), dove si trovano a livelli significativamente più bassi nei pazienti con glomerulonefrite rispetto a quelli senza l'impegno renale.

**SCOPO**

Lo scopo del progetto era valutare se gli anti-PTX3 potessero avere un ruolo protettivo e/o terapeutico nei confronti della glomerulonefrite lupica.

**MATERIALI E METODI**

Dieci topi NZB/NZWFI, un modello murino che sviluppa spontaneamente una glomerulonefrite simile a quella lupica dell'uomo a 5-7 mesi d'età, sono stati iniettati 3 volte con PTX3/allume (gruppo 1), 10 sono stati iniettati 3 volte con allume/PBS (gruppo 2), e altri 10 sono stati iniettati 3 volte con PBS (gruppo 3), come controllo. Tutte le iniezioni sono state effettuate intraderma sulle zampe posteriori a partire da 11 settimane di età, a 3 settimane di distanza l'una dall'altra. Le urine sono state raccolte settimanalmente per misurare i livelli di proteinuria, al fine di monitorare nel tempo la comparsa e la progressione della glomerulonefrite, mediante i multistix reagent.

Il sangue è stato prelevato dalla vena caudale, mensilmente, prima di ogni iniezione e dopo l'ultima iniezione, fino alla morte naturale dei topi, momento in cui sono stati prelevati da ciascuno sangue e organi. Dal siero ottenuto dal sangue si sono valutati i livelli circolanti di anti-PTX3, anti-nDNA e anti-C1q mediante tecniche ELISA home-made standardizzate. Brevemente, le piastre sono state coartate con l'antigene diluito in PBS (5µg/ml), i sieri diluiti 1:100 in 3% albumina sierica bovina (BSA) in PBS, le IgG identificate con anti-mouse IgG in 1% BSA/PBS. I reni sono stati utilizzati per effettuare analisi istologiche in ematossilina/eosina e la tricromia di Masson per valutare il grado di danno renale.

La differenza tra le medie dei livelli circolanti di anticorpi è stata calcolata mediante ANOVA, con il metodo di Bonferroni. Il tasso di sopravvivenza e di comparsa di livelli critici di proteinuria (>300 mg/dl) sono state calcolate con la formula di Kaplan-Meier con il metodo di Mantel-Cox. Per l'analisi statistica è stato utilizzato software PASW 18.

## RISULTATI

Solo il gruppo trattato con la PTX3 ha sviluppato anticorpi anti-PTX3 a partire dalla 14<sup>a</sup> settimana d'età, cioè dopo una sola iniezione (gruppo1 vs. gruppo2 vs. gruppo 3: week14:  $0.828 \pm 0.14$  vs.  $0.056 \pm 0.07$  vs.  $0.108 \pm 0.07$ ; week17:  $0.954 \pm 0.14$  vs.  $0.079 \pm 0.10$  vs.  $0.091 \pm 0.03$ ; week22:  $0.578 \pm 0.023$  vs.  $0.017 \pm 0.01$  vs.  $0.048 \pm 0.04$ ; week28:  $0.481 \pm 0.35$  vs.  $0.042 \pm 0.05$  vs.  $0.107 \pm 0.09$ ,  $p < 0.001$  per tutti) (Figura 1A). Gli anti-dsDNA e anti-C1q sono stati, invece, sviluppati da tutti i gruppi senza alcuna differenza nei titoli circolanti (gruppo 1 vs. gruppo 2 vs. gruppo3: anti-dsDNA: week14:  $0.142 \pm 0.06$  vs.  $0.134 \pm 0.04$  vs.  $0.167 \pm 0.08$ ; week17:  $0.193 \pm 0.17$  vs.  $0.217 \pm 0.12$  vs.  $0.201 \pm 0.14$ ; week22:  $0.699 \pm 0.61$  vs.  $0.739 \pm 0.51$  vs.  $0.677 \pm 0.49$ ; week28:  $1.376 \pm 0.69$  vs.  $1.216 \pm 0.66$  vs.  $1.142 \pm 0.84$ ,  $p = n.s.$  per tutti; anti-C1q: week14:  $0.188 \pm 0.05$  vs.  $0.154 \pm 0.09$  vs.  $0.189 \pm 0.08$ ; week17:  $0.244 \pm 0.04$  vs.  $0.240 \pm 0.07$  vs.  $0.270 \pm 0.09$ ; week22:  $0.405 \pm 0.14$  vs.  $0.373 \pm 0.12$  vs.  $0.453 \pm 0.12$ ; week28:  $0.529 \pm 0.09$  vs.  $0.550 \pm 0.14$  vs.  $0.554 \pm 0.11$ ,  $p = n.s.$  per tutti) (Figura 1B e C, rispettivamente). Il tasso di sopravvivenza è risultato significativamente maggiore nel gruppo 1 rispetto ai 2 gruppi di controllo ( $p = 0.039$ ) (Figura 1D). Anche l'insorgenza di valori critici di proteinuria ( $>300$  mg/dl) è risultata significativamente ritardata nel gruppo 1 rispetto ai 2 gruppi di controllo ( $p = 0.043$ ) (Figura 1E). I livelli di proteinuria, anche se non significativamente, sono sempre risultati minori nel gruppo 1 rispetto ai 2 gruppi di controllo (Figura 1F).

## CONCLUSIONI

Il trattamento di topi NZB/NZWFI con la PTX3 induce la produzione di anti-PTX3, determinando un ritardo nell'insorgenza della glomerulonefrite e un maggiore tasso di sopravvivenza.

## OBBIETTIVI FUTURI

Terminare le analisi istologiche a livello degli organi di tutti i topi, al fine di valutare se ci sono differenze macroscopiche a livello tissutale. In particolare, l'attenzione sarà volta a determinare la presenza di depositi di PTX3 e di C1q a livello renale. Infine, verrà fatta una real time-PCR al fine di terminare l'espressione genica di PTX3 a livello renale.

**Figura: A)** Confronto dei livelli circolanti di anti-PTX3, espressi come densità ottica media misurata a 405 nm; **B)** Confronto dei livelli circolanti di anti-dsDNA, espressi come densità ottica media misurata a 405 nm; **C)** Confronto dei livelli circolanti di anti-C1q, espressi come densità ottica media misurata a 405 nm; **D)** Tasso di sopravvivenza, calcolato mediante la formula di Kaplan-Meier; **E)** Insorgenza di valori critici di proteinuria ( $>300$  mg/dl), determinata con la formula di Kaplan-Meier; **F)** Livelli medi di proteinuria, espressi in mg/dl.

