

“CARATTERIZZAZIONE DI DIFFERENTI COMPONENTI AUTOIMMUNI DELLA NEFRITE LUPICA UMANA CON ANALISI PROTEOMICA DIRETTA IN BIOPSIE RENALI” (Relazione finale)

CONSIDERAZIONI GENERALI

La Nefropatia Lupica è tra le complicanze d'organo più gravi della malattia. Essa si manifesta all'esordio o durante il decorso del LES nella maggioranza dei casi (50-80%) (Cameron JS, 1999). Se non precocemente riconosciuta e trattata, conduce molto frequentemente all'insufficienza renale terminale, con necessità di terapia dialitica o trapianto renale. Dal punto di vista patogenetico costituisce il modello di riferimento delle glomerulonefriti autoimmuni. Soprattutto in base a rilievi sperimentali (Madaio MP, 2012; Waldman M, 2005; Bagavant H, 2009, Hanrotel-Saliou C, 2011) è ampiamente riconosciuto che la nefropatia lupica sia provocata dalla formazione di immunocomplessi costituiti da anticorpi con i relativi antigeni soprattutto a livello glomerulare. In particolare sono proprio questi antigeni a non essere ancora chiaramente identificati. Di conseguenza non si dispone attualmente di marcatori biologici certi, tissutali e /o sierici, in grado di svolgere funzione predittiva sulla presenza in fase precoce di nefropatia lupica o sul suo decorso.

Partendo dal presupposto che la nefropatia lupica ed il LES più in generale sono una patologia multi-autoanticorpale, lo scopo della linea di ricerca in oggetto è stato quello di identificare nella nefropatia lupica umana la tipologia degli auto-anticorpi responsabili di tale patologia e di valutare la loro reattività con gli antigeni presenti a livello glomerulare, sia che si tratti di antigeni intrinseci alla struttura glomerulare sia che si tratti di antigeni circolanti nel sangue e depositati nel glomerulo. In una prima fase abbiamo ricercato su frustoli bioptici renali non utilizzati per il processo clinico-diagnostico la presenza di immunoglobuline anti-antigeni podocitari (e quindi intrinseci al glomerulo) e la specificità di tali immunoglobuline. Abbiamo inoltre ricercato la presenza delle stesse immunoglobuline nel siero. In particolare abbiamo così identificato contemporaneamente a livello tissutale glomerulare e sierico la presenza di auto-anticorpi di classe IgG2 anti α -enolasi e anti-annessina A1 che abbiamo dimostrato essere fattori rilevanti nella genesi della nefropatia.

Tali risultati sono stati da noi pubblicati su “*Journal of American Society of Nephrology (JASN)*” (2014 Nov; 25 (11): 2483-98.) (IF 9.343).

OBIETTIVO DEL 1° ANNO DI STUDIO

Il principale obiettivo per il primo anno della ricerca proposta è stato quello di estendere lo studio sopra-riportato relativo a complessi immuni nefritogeni costituiti da antigeni appartenenti alla struttura glomerulare, con analogo metodologia, alla presenza nella nefropatia lupica umana di complessi immuni nefritogeni costituiti da antigeni depositati a livello glomerulare.

Metodologia

Gli anticorpi rivolti contro gli antigeni depositati a livello glomerulare, eluiti dai glomeruli dissecati mediante laser dissettore dalle stesse 20 biopsie del precedente lavoro (Bruschi M, JASN, 2014 Nov; 25 (11): 2483-98.), sono stati caratterizzati per la quantità, per la classe e sottoclasse e per la specificità verso i suddetti antigeni, correlando tali risultati con quelli ottenuti a livello sierico.

RISULTATI OTTENUTI NEL 1° ANNO DI STUDIO

Per quanto riguarda i glomeruli, abbiamo osservato la presenza di autoanticorpi di classe IgG2 rivolti contro il DNA, gli istoni (H2A, H3 e H4) e il C1q rispettivamente nel 50%, 55% e 70% dei campioni biotici.

Per quanto riguarda la caratterizzazione effettuata a livello sierico, le immunoglobuline di classe IgG2 anti-antigeni depositati (DNA, H3, e C1q) sono risultate quelle maggiormente espresse, anche se i livelli sierici e glomerulari degli anticorpi non sono risultati strettamente associati.

Da un punto di vista clinico, abbiamo osservato che alti livelli sierici di tutti gli autoanticorpi rilevati, inclusi quelli diretti contro l' α -enolase e l'annessina A1, hanno permesso di discriminare la nefrite lupica dal lupus eritematoso sistemico senza aspetti di nefropatia e dall'artrite reumatoide. In particolare, le immunoglobuline IgG2 anti-H3 e anti- α -enolase sono risultate notevolmente aumentate nel siero di pazienti affetti da nefropatia lupica, rappresentando così un importante fattore diagnostico di tale nefropatia.

Gli elevati livelli di questi due autoanticorpi, inoltre, sono stati associati con valori di proteinuria maggiori di 3.5 g/24h (soglia oltre la quale compare clinicamente la sindrome nefrosica) e di creatinina maggiori di 1.2 mg/dl (soglia oltre la quale si configura l'insufficienza renale). I nostri risultati quindi hanno suggerito che la caratterizzazione di particolari livelli autoanticorpali possa essere d'aiuto nella diagnosi e nel monitoraggio della risposta dei pazienti affetti da nefropatia lupica e possa portare ad una terapia mirata che dovrebbe in futuro rendere superata l'attuale terapia immunodepressiva aspecifica e quindi foriera di effetti collaterali anche gravi.

Tali risultati sono stati pubblicati recentemente dal nostro gruppo di ricerca su *Journal of American Society of Nephrology* (2015 Aug; 26 (8): 1905-24) (IF 9.343) al quale rimandiamo.

OBIETTIVO DEL 2° ANNO DI STUDIO

Il principale obiettivo del 2° anno di studio è stato quello di valutare quale possa essere nella nefropatia lupica il ruolo del processo di NETosi, di per sé fisiologico e caratterizzato dal rilascio da parte dei granulociti neutrofili soprattutto in fase di apoptosi di materiale nucleare (quale il DNA e gli istoni) e citoplasmatico (quale annessina A1 ed α -enolasi) che entra nella costituzione di una rete extracellulare la cui finalità è intrappolare patogeni extracellulari quali i batteri. A questo scopo, il fenomeno della NETosi e la costituzione proteica della stessa NET sono stati analizzati in granulociti neutrofili ottenuti da sangue periferico di pazienti con nefropatia lupica, comparandoli con quelli di pazienti affetti da LES senza interessamento renale e con soggetti di controllo.

RISULTATI OTTENUTI NEL 2° ANNO DI STUDIO

Con l'obiettivo di studiare in maniera dettagliata il fenomeno della NETosi e la costituzione proteica della stessa NET, la casistica dei soggetti arruolati è stata costituita da sei pazienti affetti da nefropatia lupica, sei da LES senza interessamento renale e sei controlli sani.

L'ipotesi alla base di questo studio è stata che i nuovi target antigenici riconosciuti da anticorpi fortemente associati alla nefrite lupica, come gli anticorpi anti-annessina AI ed anti- α enolasi, possano essere esposti come autoantigeni proprio nel processo della NETosi. Mentre è noto che componenti nucleari entrano a far parte del processo di NETosi ed in particolare nei pazienti con LES risultando quali ideali auto-antigeni, non è ancora noto se le componenti proteiche citoplasmatiche quali annessina AI ed α -enolasi partecipino a questo processo. Non è chiaro, inoltre, se un meccanismo di questo tipo possa essere più o meno accentuato nei pazienti con nefropatia lupica.

Al fine di valutare l'espressione della NETosi nei pazienti selezionati è stata eseguita un'analisi in immunofluorescenza. Per esaminare i costituenti della rete è stato utilizzato il microscopio confocale. Abbiamo così potuto osservare che nei pazienti affetti da nefropatia lupica l'entità della NETosi, definita come numero di nuclei dei neutrofili coinvolti nei processi di NETosi rispetto al totale, è risultata significativamente maggiore nei pazienti con nefropatia lupica rispetto ai pazienti con LES senza interessamento renale ed ai controlli sani (mediana 23.44% nei pazienti con nefropatia lupica, 2.81% nei pazienti con LES senza interessamento renale, 2.13% nei controlli; $p=0.002$ nel confronto nefropatia lupica vs. LES e nefropatia lupica vs. controlli)

Le immagini acquisite al microscopio confocale hanno permesso la caratterizzazione di alcuni costituenti della rete formata dai neutrofili. In particolare abbiamo confermato che sia l' α -enolasi che l'annessina AI entrano nella costituzione delle NET formate dai neutrofili dei pazienti con nefropatia lupica. In particolar modo, confrontando in modo seriato le immagini, è risultata evidente la predominanza dell' α -enolasi rispetto all'annessina AI.

Anche gli istoni (proteine basiche che costituiscono la componente strutturale della cromatina) H2A, H3 e H4 entrano a far parte della rete estrusa dai neutrofili. La persistenza di cromatina nello spazio extracellulare, che spesso è dovuta anche ad un deficit di DNAasi e di C1q, rappresenta un segnale di danno cellulare ed una fonte di autoantigeni. La presenza extracellulare degli istoni funge da trigger di autoimmunità e determina conseguentemente l'attivazione di cloni linfocitari autoreattivi. Nei pazienti con nefropatia lupica, come dimostrato da studi recenti, esiste una specifica risposta autoanticorpale nei confronti di H2A ed H3 mediata da IgG2. (Bruschi, M., et al., J Am Soc Nephrol, 2014). Nel nostro studio, l'analisi della NETosi ha permesso di dimostrare come, nei pazienti con nefropatia lupica in particolare, siano proprio gli istoni H2A ed H3 i maggiori costituenti delle NET; questo dato risulta quindi in linea con la dimostrazione di autoanticorpi circolanti diretti in particolare contro H3 nel siero di pazienti con nefropatia lupica (Bruschi, M., et al., J Am Soc Nephrol, 2014).

Concludendo, il nostro studio dimostra che il fenomeno della NETosi è significativamente più intenso nei pazienti con nefropatia lupica rispetto ai pazienti con LES senza coinvolgimento renale ed ai controlli sani. Tale processo, oltre a determinare l'esternalizzazione di materiale nucleare (ad esempio istoni H2A e H3), causa la fuoriuscita dalla cellula di proteine citoplasmatiche quali α -enolasi ed annessina AI, che possono diventare in questo modo target antigenici della risposta autoanticorpale. La presenza di questa risposta ed il ruolo auto-antigenico di α -enolasi ed annessina AI nella nefropatia lupica sono testimoniate dalla co-localizzazione a livello glomerulare delle stesse con anticorpi IgG2.

In tal modo è stata ulteriormente individuata la tipologia della risposta autoimmunitaria presente nella nefropatia lupica fornendo ulteriori futuri spunti di terapia selettiva della malattia (ad esempio anticorpi specifici anti-anticorpi) oltre a quanto già individuato nel 1° anno della ricerca.

Tali dati hanno portato alla stesura del manoscritto "Neutrophil Extracellular Traps (NETs) profile discriminates lupus subjects who develop nephritis" inviato a "Rheumatology".