

Il profilo autoanticorpale nella sclerosi sistemica: ruolo diagnostico e prognostico (Rassegna)

Danilo Villalta

Allergologia e Immunologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.O. "S Maria degli Angeli", Pordenone

INTRODUZIONE

La sclerosi sistemica (SSc) è una malattia autoimmune ad eziologia sconosciuta, caratterizzata da fibrosi della cute e di vari organi interni, pronunciate alterazioni del microcircolo e da una disregolazione immunitaria sia umorale che cellulare. La SSc ha una prevalenza di 240-280 casi per milione, interessa prevalentemente il sesso femminile, con un rapporto 3-5:1 rispetto al sesso maschile, e l'esordio avviene comunemente in giovane età tipicamente tra i 30 ed i 50 anni; il picco di incidenza è intorno ai 44 anni per gli uomini e i 42 anni per le donne¹.

Le manifestazioni cliniche della SSc possono oscillare da un interessamento cutaneo confinato al volto, dita, parte distale degli arti (sclerodattilia, acrosclerosi), con limitato interessamento degli organi interni, a una forma con interessamento cutaneo diffuso e una fibrosi severa di molti organi interni (polmone, rene, cuore, tubo digerente). In base all'estensione dell'interessamento cutaneo la SSc viene classicamente divisa in forma limitata (lcSSc) in cui sono interessate, oltre al volto, solo le parti distali alle articolazioni dei gomiti e delle ginocchia e in forma diffusa (dcSSc) in cui è interessata anche la cute prossimale alle suddette articolazioni². Tale classificazione distingue due sottogruppi della malattia che si associano a corredi autoanticorpali e prognosi diverse. La lcSSc, infatti, si associa alla presenza di autoanticorpi anti-centromero (ACA) e ad una prognosi migliore rispetto alla dcSSc, che in prevalenza si associa ad autoanticorpi anti-topoisomerasi I (anti-Scl-70). La diversità del profilo autoanticorpale suggerisce una verosimile diversità patogenetica tra le due forme, ipotesi corroborata dall'osservazione che esse in genere rimangono ben distinte, essendo piuttosto rara l'evoluzione da una forma all'altra.

La patogenesi della SSc è complessa e al momento non esiste una ipotesi patogenetica universalmente riconosciuta in grado di spiegare tutti gli aspetti della malattia. E' certo, comunque, che alla base dei caratteristici aspetti istopatologici (fibrosi viscerale e cutanea, obliterazione del lume vascolare, alterazione del microcircolo, infiltrato linfocitario) c'è un alterato funzionamento di tre tipi di cellule: cellule endoteliali, fibroblasti, linfociti T e B. Quest'ultimi, oltre a produrre le varie citochine coinvolte nei meccanismi patogenetici, sono chiamati in causa nella produzione dei diversi autoanticorpi anti-nucleo (ANA) che accompagnano la SSc.

Gli ANA sono presenti in oltre il 90% dei pazienti con SSc³. Essi rappresentano un gruppo eterogeneo di autoanticorpi diretti verso diverse specificità antigeniche, anche se in un singolo paziente in genere sono presenti autoanticorpi diretti verso una sola specificità antigenica.

Il test di screening per gli ANA è l'immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule HEp-2. Utilizzando tale test nei pazienti con SSc è possibile rilevare diversi quadri fluoroscopici, di cui i principali sono: a) centromerico; b) *diffuse grainy* o *discrete granular pattern*; c) nucleolare (Fig. 1). Mentre il primo quadro è specifico per ACA, il secondo è suggestivo per anti-Scl-70 e il terzo può associarsi a varie diverse specificità autoanticorpali (anti-fibrillarina [AFA], anti-RNA polimerasi [anti-RNAP], anti-Th/To, anti-PM-Scl). Con il test IFI, quindi, è possibile definire con certezza solo la presenza di ACA, mentre per la definizione delle altre specificità autoanticorpali associate alla SSc devono essere utilizzate altre metodiche, quali l'ELISA, l'immunoblot (IB), l'immunodiffusione (ID) e la radioimmunoprecipitazione (RIP).

AUTOANTICORPI ANTI-NUCLEO (ANA) ASSOCIATI A SSC

1) Autoanticorpi anti centromero (ACA)

Gli ACA sono stati identificati per la prima volta nel 1980, quando per la determinazione degli ANA sono state introdotte le cellule HEp-2. Con tale substrato, infatti, è

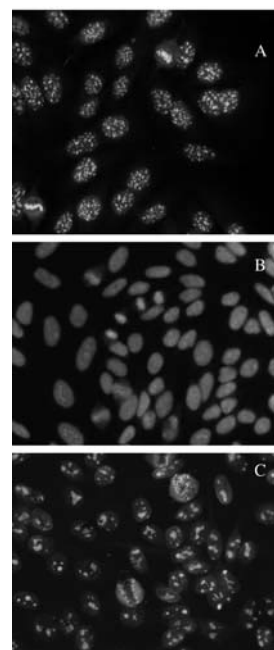


Figura 1
Principali quadri fluoroscopici di ANA in pazienti con SSc. A = quadro centromerico; B = quadro *diffuse grainy* o *discrete granular* (associato ad anti-Scl-70); C = quadro nucleolare.

stato possibile identificare il caratteristico quadro fluoroscopio degli ACA (Fig. 1). Studi successivi hanno evidenziato come sei diverse proteine fossero bersaglio di tali autoanticorpi (da CENP-A a CENP-F). CENP-A è una proteina centromero-specifica, istone-H3-simile di 17 kDa; CENP-B è una proteina di 80 kDa che si lega al DNA in forma aploide; CENP-C è una proteina di 140 kDa che interviene nell'assemblaggio del cinetocore; CENP-D è una molecola di 50 kDa, di cui non è ancora conosciuta la funzione; CENP-E è una *kinesin-like protein* ad alto peso molecolare (312 kDa); e infine CENP-F è una proteina della matrice nucleare che si accumula nella matrice nella fase S e nel cinetocore durante la fase G2. Tutti i sieri con reattività ACA, comunque, reagiscono con CENP-B^{4,5}, per cui tale molecola da sola è usata come substrato antigenico, per la determinazione degli ACA con metodi ELISA, i quali sono dotati di una buona accuratezza diagnostica⁶.

Gli ACA sono presenti nel 20-40% dei pazienti con SSc, con una prevalenza maggiore nei caucasici rispetto agli ispanici e agli afro-americani. Hanno una specificità per SSc superiore al 90%, essendo solo raramente positivi in altre connettiviti (CTD)^{7,8}; possono, però, essere presenti in una certa percentuale di pazienti con cirrosi biliare primitiva.

Si associano prevalentemente, ma non esclusivamente, alla lcSSc, dove possono essere presenti fino nel 90% dei casi, come confermato anche dall'*EULAR Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group*⁹. I pazienti ACA-positivi hanno una migliore prognosi rispetto a quelli con positività per anti-Scl-70 e positività anti-nucleolo (ANoA) e presentano una minor frequenza di fibrosi polmonare. Si possono comunque associare a ipertensione polmonare. In passato la positività ACA veniva associata alla variante CREST (calcinosi, fenomeno di Raynaud, dismotilità esofagea, sclerodattilia, telangectasia) che ora non viene più riconosciuta come entità nosologica a se stante, ma che è vista piuttosto come una sottoclasse della lcSSc. Quando la positività ACA è trovata in soggetti con fenomeno di Raynaud isolato, essa può essere predittiva di sviluppo futuro di SSc.

La positività ACA, infine, si associa con alcuni alleli HLA (HLA-DRB1 e HLA-DQB1, nonché con alcuni polimorfismi del *Tumor Necrosis Factor* (TNF) (TNF-863-A a TNF-1031C)¹⁰⁻¹¹.

Per la rilevazione degli ACA il metodo di IFI su HEP-2 è specifico e presenta livelli di sensibilità paragonabili ai metodi ELISA e pertanto una positività ACA all'IFI non necessita di ulteriori conferme con altri metodi, salvo rari quadri che possono essere di difficile interpretazione per contemporanea presenza di altre positività autoanticorpali.

2) Autoanticorpi anti-topoisomerasi I (anti-Scl-70)

Tale positività autoanticorpale è stata identificata nel 1979 quando per la prima volta furono descritti da Douvas et al¹² nel siero di pazienti con SSc, con il metodo della immunodiffusione doppia (DID), autoanticorpi rivolti verso una proteina basica, non istonica associata alla cromatina, di apparente PM di 70 kDa, che in seguito è stata identificata con la topoisomerasi I, molecola enzimatica di 100 kDa, localizzata nel nucleoplasma, nel nucleolo in stretta

correlazione con la RNAP I e nei cromosomi durante la mitosi, capace di modificare la superstruttura del DNA nativo mediante una modifica del numero di giri della doppia elica.

Gli anti-Scl-70 sono riscontrati in circa il 15-40% dei pazienti con SSc, con una frequenza maggiore nella dsSSc rispetto alla lcSSc⁷. L'ampia oscillazione della frequenza di positività riportata nei diversi studi dipende da fattori genetici e razziali, dalla selezione della casistica e dai diversi metodi di laboratorio utilizzati per la rivelazione autoanticorpale. Nei pazienti con dsSSc, gli anti-Scl-70 sono presenti con minor frequenza nelle popolazioni caucasiche americane (29%) rispetto alle popolazioni asiatiche (68%). Lo studio EUSTAR riportò una prevalenza del 64% nella dsSSc e del 34% nella lcSSc⁹. In tutte le casistiche la contemporanea presenza di anti-Scl-70 e ACA è un evento raro (<0,05%)¹³.

Pazienti con positività per anti-Scl-70 hanno un maggiore rischio di sviluppare una fibrosi polmonare già nelle fasi precoci della malattia e presentano una maggiore mortalità. Non è chiara, invece, la correlazione con il coinvolgimento renale. Alcuni studi hanno riportato un rischio aumentato di sviluppo di neoplasie polmonari e mammarie in soggetti anti-Scl-70 positivi^{14,15}, ma ciò non è stato confermato da altri studi¹⁶, per cui tale correlazione rimane incerta.

Come gli ACA anche gli anti-Scl-70 sembrano associarsi ad alcuni alleli HLA (DRB1, DQB1 e DPB1) e a specifici polimorfismi TNF (TNF-857T)¹⁷.

Gli anti-Scl-70 sono identificabili con il metodo IFI su HEP-2 dove determinano un caratteristico quadro fluoroscopio, costituito da una positività multipla finemente granulata (*granulia diffusa o diffuse grainy o discrete granular pattern*) del nucleoplasma e dei nucleoli, nonché di NOR e dei cromosomi nelle cellule in mitosi¹⁸. Tale quadro fluoroscopio, comunque, anche se suggestivo per anti-Scl-70 non è specifico, per cui per l'identificazione di tale specificità autoanticorpale sono richiesti altri metodi. Per lungo tempo i metodi di riferimento sono stati la DID e la controimmunoelettroforesi (CIE), che usavano estratti nucleari da timo di vitello. La labilità dell'enzima topoisomerasi I durante il processo di estrazione comportava particolare attenzione nell'esecuzione di tali metodiche, che, pur essendo molto specifiche, risultavano poco sensibili. Attualmente tali tecniche sono state quasi completamente soppiantate da tecniche ELISA, IB o ID che in genere utilizzano antigeni ricombinanti. Uno studio multicentrico condotto dal gruppo di Studio in Autoimmunologia (GdS-AI) della SIMeL¹⁹, ha evidenziato come tali metodi abbiano una sensibilità superiore al metodo CIE, pur mantenendo una elevata specificità.

Sebbene alcuni studi abbiano correlato le variazioni dei livelli di anti-Scl-70 con l'estensione della malattia e in alcuni casi abbiano evidenziato la negativizzazione autoanticorpale nelle fasi di remissione, ciò non è stato confermato da altri studi. Una nostra esperienza, infine, ha dimostrato come nella maggior parte dei casi i metodi ELISA impiegati nella pratica clinica non siano accurati nella determinazione quantitativa del contenuto autoanticorpale²⁰. Per queste ragioni, nella pratica clinica il monitoraggio autoanticorpale non è indicato.

3) Autoanticorpi anti-nucleolo (ANoA)

Gli ANoA sono presenti nel 15-40%¹⁷ dei pazienti con SSc e comprendono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi, in genere mutualmente esclusivi, quali anti-RNAP, AFA, Th/To, PM-Scl. Fra gli anti-RNAP (anti-RNAP-I, anti-RNAP-II e anti-RNAP-III) solo gli anti-RNAP-I si associano esclusivamente ad un quadro di tipo anti-nucleolare in IFI. Anche se il quadro fluoroscopico delle diverse specificità autoanticorpali responsabili della positività anti-nucleolare può differire (nucleolare omogeneo, *speckled*, *clumpy*)²¹, per la definizione delle singole specificità autoanticorpali devono essere usati metodi diversi dall'IFI su HEp-2. Sino a pochi anni fa il metodo utilizzato era la RIP, eseguibile solo in pochi centri e nella maggior parte dei casi a scopo di ricerca. Fortunatamente negli ultimi anni sono apparsi sul mercato metodi ELISA o IB, che hanno permesso la determinazione delle suddette specificità anticorpali nella pratica clinica.

a) anti-RNAP I,II,III

Gli anticorpi anti-RNAP sono stati identificati per la prima volta nel 1982²² e successivamente caratterizzati come autoanticorpi rivolti verso tutte e tre le classi di RNAP (RNAP I, II e III). Gli anti-RNAP-I/III sono specifici per SSc, mentre anti-RNAP II possono essere presenti anche in pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES) e nelle sindromi overlap. RNAP-I e III coesistono e la prevalenza in pazienti con SSc varia dal 4 al 25%, a seconda del metodo utilizzato per il rilevamento e l'area geografica di provenienza²³. Essi si associano a dsSSc (35-45% dei pazienti) e a interessamento renale (crisi renale)²⁴, mentre la fibrosi polmonare è meno frequente nei pazienti con tale autoanticorpo. Nonostante la maggiore prevalenza di interessamento renale, la sopravvivenza dei pazienti con anti-RNAP è superiore a quella dei pazienti con anti-Scl-70 e ciò è dovuto sia alla minor frequenza di fibrosi polmonare che al buon controllo delle crisi renali con gli ACE-inibitori²⁵.

Con il metodo IFI su HEp-2 i sieri contenenti anti-RNAP I/III mostrano un quadro eterogeneo di fluorescenza (*speckled*, senza positività nucleolare; nucleolare con o senza positività nucleo-plasmatica associata; nucleolare *speckled*)²⁶. Non è quindi possibile identificare tale positività autoanticorpale con il metodo IFI.

Il *gold standard* per la identificazione di tali autoanticorpi è stato per anni la RIP utilizzando estratti cellulari (HeLa o K562) ³⁵S metionina-marcata. Recentemente Kuwana e coll. comunque, hanno identificato l' epitopo immunodominante della subunità RPC155C della RNAP III²⁶ e lo hanno prodotto in forma ricombinante. Tale molecola è stata utilizzata per allestire un sistema ELISA per la determinazione degli anti-RNAP III, che ha dimostrato di possedere un'accuratezza analitica e diagnostica sovrapponibile alla RIP^{27,28}. E' quindi ora possibile determinare tale specificità autoanticorpale anche nei laboratori diagnostici con metodi commerciali ELISA o IB dotati di buona accuratezza.

b) AFA

Gli AFA hanno come bersaglio la fibrillarina, una proteina appartenente alla famiglia delle piccole ribonucleoproteine nucleolari (snoRNP). Queste sono rappresentate da

due diversi complessi macromolecolari, il box C/D snoRNP e il box H/ACA snoRNP. Mentre gli autoanticorpi contro il complesso H/ACA sono raramente presenti nei pazienti con malattie autoimmuni, autoanticorpi diretti verso il complesso macromolecolare box C/D (U3snoRNP) sono rilevabili in pazienti con SSc. Fra questi gli autoanticorpi più importanti in diagnostica sono quelli diretti verso la fibrillarina, una delle proteine componenti il complesso U3snoRNP. Essi sono presenti in proporzioni variabili tra l'1 e il 22%, a seconda dei gruppi etnici²⁵. Sono, infatti, più frequenti nella popolazione di origine africana rispetto alla popolazione caucasica. Nella prima sono esclusivamente associati a dsSSc, mentre nella seconda tale associazione non è esclusiva³⁰. Gli AFA sono comunque specifici per SSc in ambedue i gruppi etnici e sembrano associarsi preferenzialmente a miosite e ipertensione polmonare. Meno chiara è la loro associazione con le crisi renali e l'interessamento cardiaco. Sembrano essere predittivi di un decorso più severo e di prognosi peggiore nella popolazione di razza nera; ciò è più controverso nella popolazione di razza bianca³¹.

Tale positività autoanticorpale può essere sospettata utilizzando il metodo IFI su Hep-2, quando si è in presenza di un quadro nucleolare di tipo *clumpy*. Per la identificazione della specificità autoanticorpale il metodo di elezione rimane la RIP. Di recente sono stati messi a punto dei metodi ELISA e dei metodi IB, utilizzando come substrato una fibrillarina ricombinante e i primi risultati dell'utilizzo di tali metodiche sembrano essere confortanti³².

c) anti-Th/To

Gli autoanticorpi anti-Th/To, identificati per la prima volta nel 1983³³ sono rivolti verso un complesso polipeptidico comune alle ribonucleasi MRP e P³⁴.

Tali autoanticorpi hanno una alta specificità per SSc, anche se in rari casi possono essere identificati in pazienti con artrite reumatoide, LES e sindrome di Sjögren³⁵. Essi hanno una prevalenza del 2-5%, in genere si associano a lcSSc e in una certa percentuale di casi (28-32%) ad ipertensione polmonare. A differenza dei pazienti ACA positivi, quelli Th/To positivi presentano anche un alto rischio di sviluppare una fibrosi polmonare³⁶. Vista l'associazione con la fibrosi e l'ipertensione polmonare, almeno nella coorte di Pittsburg tali autoanticorpi sembrano associarsi ad una prognosi peggiore e a minor sopravvivenza, anche se ciò non sembra essere confermato in altre coorti di pazienti^{37, 38}.

Con il metodo IFI su Hep-2 gli anti-Th/To si associano ad un quadro nucleolare omogeneo. La loro identificazione avviene con tecniche di RIP, anche se del tutto recentemente sono apparse sul mercato metodi IB per la loro determinazione, la cui accuratezza analitica e diagnostica è ora oggetto di valutazione.

d) anti-PM/Scl

Gli autoanticorpi anti-PM/Scl sono stati i primi autoanticorpi anti-nucleolo scoperti. La loro identificazione, infatti, risale al 1977, quando Wolfe e coll.³⁹ rilevarono con la tecnica della immunodiffusione doppia secondo Ouchterlony tali autoanticorpi in pazienti con la sindrome *overlap* polimiosite/sclerodermia (PM/SSc). Gli anti-PM/Scl sono diretti verso il complesso macromolecolare

costituente l'esosoma umano, struttura composta da un core di 10 polipeptidi (PM da 20 a 110 kDa), che presentano una elevata omologia con le esonucleasi batteriche (*E. coli*) e fungine (*S. cerevisiae*). I bersagli autoanticorpali sono prevalentemente due polipeptidi, rispettivamente di 100 kDa e di 75 kDa. In passato era stato evidenziato che praticamente tutti i sieri positivi per PM/Scl reagivano con la componente di 100 kDa, mentre solo il 50-60% dei sieri sembravano reagire con il polipeptide di 75 kDa. Studi più recenti hanno evidenziato come la proteina PM/Scl 75 contenga una parte N-terminale importante per l'antigenicità della proteina⁴⁰, così che usando l'isoforma PM/Scl 75c si hanno percentuali di reattività sovrapponibili a quelle di PM/Scl-100.

Gli autoanticorpi anti-PM/Scl sono presenti nel 5-8% dei pazienti con miosite, nel 3% dei pazienti con sola sclerodermia e in circa il 25% dei pazienti con sindrome *overlap* PM/SSc⁴¹. Sono, invece, raramente presenti nelle coorti di pazienti giapponesi. Pazienti con positività anti-PM/Scl presentano una forma localizzata di sclerodermia (lcSSc), hanno un maggiore rischio di sviluppare fibrosi polmonare e ulcerazioni delle dita, ma hanno minore probabilità di sviluppare ipertensione polmonare. In genere essi presentano una buona risposta a bassi dosaggi cortisonici e un decorso favorevole.

Con il metodo IFI su HEp-2 gli anti-PM/Scl sono responsabili di una fluorescenza nucleolare di tipo omogeneo. Per la loro identificazione è ormai abbandonato il metodo della DID e si usano metodi ELISA o IB, utilizzando come autoantigene il polipeptide di 100 kDa, oppure il suo epitopo immunodominante (PM 1-Alpha)⁴², e il polipeptide di 75 kDa. Ci sono recenti evidenze che anti-PM/Scl 75c e anti-PM/Scl 100 sono marcatori di differenti sottoclassi di SSc^{43,44}.

e) anti-human upstream binding factor (anti-hUBF) in precedenza anti-NOR 90

Gli autoanticorpi inizialmente descritti come *anti-nucleolar organizing region* (NOR) 90 (45) è ora evidente che riconoscono hUBF come autoantigene⁴⁶. Essi non sono specifici per SSc in quanto possono essere presenti in altre malattie reumatiche autoimmuni quali artrite reumatoide, LES, Sindrome di Sjögren, Raynaud isolato e anche in alcune neoplasie. Pazienti con anti-hUBF hanno frequentemente una lcSSc, un limitato interessamento degli organi interni e un decorso in genere più favorevole⁴⁷.

Tale positività autoanticorpale si associa ad un quadro fluoroscopico tipico, caratterizzato da una fluorescenza granulare dei nucleoli delle cellule in interfase; le cellule in metafase presentano degli spots con fluorescenza brillante nell'area della cromatina condensata⁴⁸. La specificità autoanticorpale può ora essere definita tramite metodi IB.

4) Altri autoanticorpi presenti nella SSc

a) anti-Ku

Gli anti Ku originariamente descritti in pazienti con sindrome *overlap* PM/SSc e ritenuti specifici per SSc (49), in realtà in successivi studi sono stati descritti anche in pazienti con LES, connettivite mista (MCTD), PM/DM, malattia di Graves⁵⁰. Tali autoanticorpi sono rivolti verso

una proteina dimerica (p70/p80) con funzione di proteinasi DNA-dipendente, localizzata nel nucleo e nei nucleoli. Con il metodo IFI su Hep-2 determinano una positività con quadro finemente granulare del nucleo e dei nucleoli, spesso con positività anche della cromatina. La identificazione che originariamente era fatta con metodi di ID e RIP, ora è eseguita con metodi ELISA e IB.

Nei pazienti con SSc tali anticorpi sembrano associarsi alla presenza di miosite⁵¹.

b) Anti-U1RNP

Gli anti-U1RNP sono autoanticorpi diretti verso proteine spliceosomiali RNA-associate ricche in uridina. Essi si riscontrano in pazienti con LES (25-47% dei casi) e nella totalità dei casi dei pazienti con MCTD. La prevalenza nella sclerodermia è di circa il 6% (intervallo: 2-14%)⁵². Pazienti con SSc e anti-U1RNP positivi hanno un minore ispessimento cutaneo e una minore prevalenza dell'interessamento renale, mentre sembrano avere un rischio maggiore di sviluppare ipertensione polmonare, fenomeno di Raynaud, artrite e disfunzioni esofagee. In genere rispondono bene alla terapia steroidea e hanno una prognosi favorevole⁵³.

Con il metodo IFI su Hep-2 essi producono un quadro fluoroscopico di tipo *coarse speckled* e la loro identificazione viene eseguita con metodi ELISA.

c) Anti-Platelet-Derived Growth Factor Receptor (anti-PDGFR)

Tali autoanticorpi identificati recentemente da Baroni e coll⁵⁴ sembrano essere specifici per SSc, anche se un recentissimo studio ha evidenziato la loro presenza in soggetti con LES⁵⁵. È stato ipotizzato che gli anti-PDGFR possano avere un ruolo patogenetico, in quanto analogamente a PDGF, legandosi al PDGFR potrebbero attivare i fibroblasti a produrre prodotti reattivi dell'ossigeno e collagene e indurre la conversione dei fibroblasti a miofibroblasti. Tale ipotesi, comunque, seppure suggestiva aspetta ancora conferme. E di recente è stato rilasciato sul mercato un metodo IB per la loro determinazione.

d) Anti-cellule endoteliali (AECA) e anti-fibrillina-1

Gli AECA furono originariamente descritti da Salojin e coll⁵⁶ in soggetti con fenomeno di Raynaud primitivo e SSc. Successivi studi confermarono che AECA sono presenti nel 25-85% dei pazienti con SSc, ma anche in altre malattie autoimmuni in cui sia presente un danno endoteliale. Essi sono stati associati con quadri più severi di Raynaud, ischemia e ulcere digitali, ipertensione e fibrosi polmonare⁵⁷. Gli AECA sembrano rivestire un ruolo patogenetico nella SSc, specialmente per quanto riguarda il danno vascolare. Essi sono in grado di indurre l'apoptosi (tramite la via della caspasi 3) delle cellule endoteliali, con conseguente iperespressione di fibrillina-1 che favorisce la successiva produzione di autoanticorpi anti-fibrillina-1, presenti in oltre il 50% dei pazienti con SSc, ma non specifici per la stessa in quanto ritrovati anche nella MCTD. Gli anti-fibrillina-1 non sembrano differenziare diverse sottoclassi di SSc

Gli AECA possono essere identificati con metodo IFI, che però presenta bassa sensibilità, tramite *Western blot*

Malattie autoimmuni sistemiche

e metodi ELISA. Per la loro bassa sensibilità e specificità e per alcune limitazioni tecniche legate alle metodiche di rilevamento, tali autoanticorpi non sono ritenuti utili a scopo diagnostico⁵⁸.

In conclusione, quindi, da quanto sopra esposto appare chiaro come nella SSc sia presente un ampio spettro di autoanticorpi, in genere fra loro mutualmente esclusivi, che rivestono un importante ruolo diagnostico e prognostico, essendo in grado di classificare i pazienti con SSc in varie sottoclassi caratterizzate da una diversa estensione

cutanea della fibrosi, un diverso interessamento d'organo e un diverso decorso clinico (Tab. 1).

Il recente sviluppo di metodi semplici e accurati permette ora la determinazione della maggior parte di tali autoanticorpi nei laboratori clinici e ciò sarà importante per confermare su ampie casistiche, composte da pazienti di diverse razze e di diverso corredo genetico, quanto rilevato in precedenza da studi su popolazioni limitate, geneticamente ristrette e con metodi non utilizzabili nella diagnostica routinaria.

Tabella 1

Frequenza autoanticorpale e principali correlazioni cliniche.

Autoanticorpo	Metodi	Prevalenza in SSc	Associazioni HLA	Associazioni cliniche	Prognosi
ACA	IFI ELISA IB	20-40% (> nei caucasici rispetto ispanici e afro-americani)	HLA-DRB1 HLA-DQB1	◆lcSSc ◆CREST ◆IpPol senza FibPol ◆Protettiva per FibPol e ◆CRS	Migliore rispetto altri autoanticorpi in particolare anti-Scl-70
Anti-Scl-70	IFI* ELISA IB	15-40% (> negli asiatici rispetto ai caucasici)	HLA-DRB1 HLA-DQB1 HLA-DPB1	◆dcSSc > lcSSc ◆FibPol	Peggiora rispetto ad altri autoanticorpi in particolare ACA
Anti-RNAP	IFI* RIP ELISA IB	4-25% (< nei caucasici rispetto afro-americani)	HLA-DQB1?	◆dcSSc ◆CRS ◆IpPol	Migliorata con l'avvento degli ACE-inibitori
AFA	IFI* RIP ELISA IB	1-22% (< nei caucasici rispetto afro-americani)	HLA-DQB1?	◆dsSSc ◆miosite ◆IpPol	Decorso più severo nella razza nera
Anti-Th/To	IFI* RIP IB	2-5%	HLA-DRB1*11	◆lcSSc ◆IpPol ◆FibPol	Decorso più severo (coorte di Pittsburgh) non confermato in altre coorti
Anti-PM/Scl	IFI* DID ELISA IB	~3% SSc 5-8% SSc con miosite ~25% PM/SSc	HLA-DQA1*0501 HLA-DRB1*11	◆lcSSc ◆PM/SSc <i>overlap</i> ◆FibPol ◆Ulcerazioni dita	Benigno buona risposta alla terapia cortisonica
Anti-U1RNP	IFI* ELISA IB	2-14%	HLA-DQA1*0101 HLA-DQB1*0501 HLA-DQB1*0302	◆Sindromi <i>overlap</i> (MCTD) ◆IpPol ◆Artrite ◆Disfunzioni esofagee	Abbastanza buona con discreta risposta alla terapia cortisonica
Anti-Ku	IFI* RIP ELISA IB	1-3%	?	◆Miosite ◆Interessamento articolare	?

Legenda: ACA= anti-centromero; AFA= anti-fibrillarina; FibPol= fibrosi polmonare; IpPol= ipertensione polmonare; CRS= crisi renale sclerodermica; lcSSc= scleroderma cutanea limitata; dcSSc= scleroderma cutanea diffusa; PM/SSc= sindrome *overlap* scleroderma/polidermatomiosite; MCTD= malattia mista del connettivo; IFI= immunofluorescenza indiretta; DID= immunodiffusione doppia; RIP= radioimmunoprecipitazione; IB= Immunoblot.

*il metodo IFI è usato come test di screening, ma la specificità anticorpale è definita con altre metodiche.

BIBLIOGRAFIA

1. **Steen VD, Oddis CV, Conte CG.** Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County, Pennsylvania: a twenty-year study of hospital-diagnosed cases 1963-1982. *Arthritis Rheum* 1997;40:441-5
2. **LeRoy E, Black C, Fleischmajer R.** Scleroderma (Systemic Sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;12:202-5
3. **Tan EM.** Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989;44:93
4. **Earnshaw WC, Machlin PS, Bordwell BJ, et al.** Analysis of anticentromere autoantibodies using cloned autoantigen CENP-B. *Prot Natl Acad Sci USA* 1987; 84:4979-83
5. **Masumoto H, Masukata H, Moro Y, et al.** A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short spe-

- cific sequence in alpoind DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 1989;109:1963-73
6. **Gonzales-Buitrago JM, Gozales C, Hernando M, et al.** Antibodies to centromere antigens measured by an automated enzyme immunoassay. *Clin Chim Acta* 2003; 328:135-8
 7. **Reveille JD, Solomon DH.** Evidence-based guidelines for the use of immunologic test: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;49:399-412
 8. **Makinen D, Fritzler M, Davis P, et al.** Anticentromere antibodies in primary biliary cirrhosis. *Arthritis Rheum* 1983;26:914-7
 9. **Walker UA, Tyndall A, Czirják L, et al.** Clinical assessment of organ manifestations in systemic sclerosis – a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research (EUSTAR) group data base. *Ann Rheum Dis* 2007;66:854-63
 10. **Reveille JD, Fischbach M, McNearney T, et al.** Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups : a comparison of clinical, sociodemographic, serologic, and immunogenetic determinants. *Semin Arthritis Rheum* 2001;30:332-46
 11. **Sato H, Lagan AL, Alexopoulou C, et al.** The TNF-863A allele strongly associates with anticentromere autoantibody positivity in scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004;50:558-64
 12. **Douvas AS, Achten M, Tan EM.** Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human anti-nuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem* 1979; 254:10514-22
 13. **Dick T, Mierau R, Bartz-Bazzanella P, et al.** Coexistence of antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:121-7
 14. **Peters-Golden M, Wise RA, Hochberg M, et al.** Incidence of lung cancer in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1985;12:1136-9
 15. **Rothfield N, Kurtzman S, Vasques-Abad D, et al.** Association of anti-topoisomerase I with cancer. *Arthritis Rheum* 1992;35:724
 16. **Derk CT, Sakkas LI, Rasheed M, et al.** Autoantibodies in patients with systemic sclerosis and cancer; a case-control study. *J Rheumatol* 2003;30:1994-6
 17. **Ho KT, Reveille JD.** The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2003;5:80-93
 18. **Dellavance A, Gallindo C, Guanaes Soares M, et al.** Redefining the Scl-70 indirect immunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific compound immunofluorescence pattern. *Rheumatol* 2009;48:632-7
 19. **Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, et al.** Sensitivity and specificity of immunological methods for the detection of anti-topoisomerase I (Scl70) autoantibodies: results of a multicenter study. *Clin Chem* 2000;46:1681-5
 20. **Villalta D, Bizzaro N, Platzgummer S, et al.** Accuracy of semiquantitative immunoenzymatic methods in quantitation of anti-topoisomerase I (Scl-70) antibodies. *Clin Rheumatol* 2005;24:453-9
 21. **Grassegger A, Phola-Gubo G, Frauscher M, et al.** Autoantibodies in systemic sclerosis (scleroderma): clues for clinical evaluation, prognosis and pathogenesis. *Wien Med Wochenschr* 2008;158:19-28
 22. **Stetler DA, Rose KM, Wemger ME, et al.** Antibodies to distinct polypeptides of RNA polymerase I in sera of patients with rheumatic autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:7499-503
 23. **Meyer OC, Fertig N, Lucas M, et al.** Disease subsets, antinuclear antibody profile, and clinical features in 127 French and 247 US adult patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2007;34:104-9
 24. **Reimer G, Steen VD, Penning CA, et al.** Correlates between autoantibodies to nucleolar antigens and clinical features in patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1988;31:525-32
 25. **Steen VD.** Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35:35-42.
 26. **Tozzoli R, Villalta D.** Anti-RNA polymerase III antibodies. In *Autoantibodies*. Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL Editors: Elsevier B.V. 2007, 2nd edition; pp 247-54
 27. **Kuwana M, Kimura K, Kawarami Y.** Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera. *Arthritis Rheum* 2002;46:2742-7
 28. **Kuwana M, Okano Y, Pandey JP, et al.** Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-RNA polymerase III antibody. *Arthritis Rheum* 2005;52:2425-32
 29. **Codullo V, Morozi G, Bardoni A, et al.** Validation of a new immunoenzymatic method to detect antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25:373-7
 30. **Arnett FC, Reveille JD, Pollard KM, et al.** Autoantibodies to fibrillarin in systemic sclerosis (scleroderma): an immunogenetic, serologic, and clinical analysis. *Arthritis Rheum* 1996;39:1151-60
 31. **Aggarwal R, Lucas M, Fertig N, et al.** Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2009;60:1112-8
 32. **Villalta D, Morozi G, Tampona M, et al.** Antibodies to fibrillarin, PM-Scl and RNA polymerase III detected by ELISA assays in patients with systemic sclerosis. *Clin Chim Acta* 2010;411:710-3
 33. **Reddy R, Tan EM, Hennig D, et al.** Detection of a nucleolar 7-2 ribonucleoprotein and cytoplasmic 8-2 ribonucleoprotein with autoantibodies from patients with scleroderma. *J Biol Chem* 1983;258:1383-6
 34. **van Eenennaam H, Vogelzangs JH, Lugtenberg D, et al.** Identity of the RNAase MRP- and RNAase P-associated Th/To autoantigen. *Arthritis Rheum* 2002;46:3266-72
 35. **Mitri GM, Lucas M, Fertig N, et al.** A comparison bet-

- ween anti-Th/To and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 2003;48:203-9
36. **Nihtyanova SI, Denton CP.** Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6:112-6
 37. **Ioannidis JPA, Vlachoyiannopoulos PG, Haidich AB.** Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data. *Am J Med* 2005; 118:2-10
 38. **Ceribelli A, Cavazzana I, Franceschini F, et al.** Anti-Th/To are common antinucleolar autoantibodies in Italian patients with scleroderma. *J Rheumatol* 2010;37:2071-5
 39. **Wolfe JF, Adelstein E, Sharp GC.** Antinuclear antibodies with distinct specificity for polymyositis. *J Clin Invest* 1977;15:549-60
 40. **Raijmakers R, Renz M, Wiemann C, et al.** PM-Scl 75 is the main autoantigen in patients with the polymyositis/scleroderma overlap syndrome. *Arthritis Rheum* 2004;50:56-9
 41. **Tozzoli R.** Gli anticorpi anti-antigeni del nucleolo. In: *Il laboratorio nelle malattie reumatiche autoimmuni*. R. Tozzoli, N. Bizzaro, D. Villalta, E. Tonutti Eds. Società Editrice Esculapio, Bologna 2007, pp 200-5
 42. **Mahler M, Fritzler MJ.** PM1-Alpha ELISA: The assay of choice for the detection of PM/Scl autoantibodies? *Autoimmun Rev* 2009;8:373-8
 43. **Hanke K, Brückner CS, Dährich C, et al.** Autoantibodies against PM/Scl-75 and PM/Scl-100 are independent markers for different subsets of systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R22
 44. **Mahler M, Raijmakers R.** Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmun Rev* 2007;6:432-7
 45. **Rodriguez-Sanchez JL, Gelpi C, Juarez C, et al.** A new autoantibody in scleroderma that recognizes a 90-kDa component of the nucleolus-organizing region of chromatin. *J Immunol* 1987;139:2579-84
 46. **Chan EK, Imai H, Hamel JC, et al.** Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. *J Exp Med* 1991;174:1239-44
 47. **Dagher JH, Scheer U, Voit R, et al.** Autoantibodies to NOR 90/hUBF: longterm clinical and serological follow-up in a patient with limited systemic sclerosis suggests an antigen driven immune response. *J Rheumatol* 2002; 29:1543-7
 48. **Antico A, Tampona M.** Gli anticorpi anti-nucleolo. In *Il laboratorio nelle malattie reumatiche autoimmuni*. R. Tozzoli, N. Bizzaro, D. Villalta, E. Tonutti Eds. Società Editrice Esculapio- Bologna 2007, pp 128-58
 49. **Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, et al.** Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 1991;68:611-20
 50. **Reeves WH, Satoh M, Stojanov L, et al.** Ku and Ki autoantibodies. In Peter JB, Shoenfeld Y Eds. *Autoantibodies*. Amsterdam: Elsevier 1996. pp 449-55
 51. **Rozman B, Cucnik S, Sodin-Semrl S, et al.** Prevalence and clinical association of anti-Ku antibodies in patients with systemic sclerosis: a European EUSTAR-initiated multi-centre case control study. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:1282-6
 52. **Hamaguchi Y.** Autoantibody profiles in systemic sclerosis: Predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol* 2010;37:42-53
 53. **Lundberg I, Hedfors E.** Clinical course of patients with anti-RNP antibodies. A prospective study of 32 patients. *J Rheumatol* 1991;18:1511-9
 54. **Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, et al.** Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354:2667-76
 55. **Kurasawa K, Arai S, Owada T, et al.** Autoantibodies against platelet-derived growth factor receptor alpha in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 2010;20:458-65
 56. **Salojin KV, Le Tonqueze M, Saraux A, et al.** Antiendothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. *Am J Med* 1997;102:178-85
 57. **Wusirika R, Ferri C, Marin M, et al.** The assessment of anti-endothelial cell antibodies in scleroderma-associated pulmonary fibrosis. A study of indirect immunofluorescent and western blot analysis in 49 patients with scleroderma. *Am J Clin Pathol* 2003;120:596-606
 58. **Ronda N, Meroni PL, Raschi E, et al.** Anti-endothelial cell autoantibodies. In *Autoantibodies*. Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL Eds: Elsevier B.V. 2007, 2nd edition; pp 725-31

Per corrispondenza:

Dott. Danilo Villalta
Dipartimento di Medicina di Laboratorio
A.O. "S. Maria degli Angeli"
Via Montereale 24, 33170 Pordenone
Tel.: 0434399647 - Fax: 0434399344
email: danilo.villalta@aopn.fvg.it