

ANTICORPI NON ORGANO SPECIFICI E GRAVIDANZA DEFINIZIONE E FISIOPATOLOGIA

Herbert Valensise, Barbara Vasapollo, Natalia Lazzarin

Clinica Ostetrica e Ginecologica Università di Roma Tor Vergata

Dalla relazione presentata in data 25 marzo 2006 nel Convegno : 'Disordini dell'immunità in gravidanza'

Bologna - Policlinico s. Orsola

Indirizzo per corrispondenza: Prof. Herbert Valensise

Ospedale Fatebenefratelli, Isola Tiberina, 39 - 00186 Roma

tel: +39 06 68809988; e-mail: valensise@med.uniroma2.it

ABSTRACT

The authors report the main informations regarding the dosage of Non Organ Specific autoantibodies (NOS) in pregnancy. Special attention is dedicated to the laboratory evaluation of the different autoantibodies. The significance of the positivity is linked to the immunological disease already diagnosed (Lupus Erythematosus) or suspected. The pathophysiology of the vascular mechanism responsible of the pathology of pregnancy linked to the presence of NOS autoantibodies is summarized. The major hypothesis on the possible protective effect of the heparin in the prevention and treatment of the disease is presented.

Key words: NOS autoantibodies and pregnancy; Recurrent miscarriage

RIASSUNTO

Gli Autori riassumono le principali evidenze sulla ricerca degli anticorpi non organo specifici (NOS) in gravidanza e le correlazioni esistenti con l'evoluzione del processo riproduttivo. Viene in particolare sottolineata la potenzialità dei metodi di laboratorio nella identificazione dei titoli anticorpali e la necessità di orientare la ricerca solo in patologie sospettate o evidenti. Viene inoltre riassunta la fisiopatologia del danno vascolare che gli anticorpi NOS possono determinare in gravidanza e come vengono ipotizzate le possibilità terapeutiche di alcune sostanze farmacologiche.

Parole chiave: Anticorpi NOS e gravidanza; Aborto ricorrente

La ricerca di anticorpi non organo specifici è spesso richiesta dal medico nella valutazione degli insuccessi gravidici. È tuttavia importante differenziare se questa valutazione viene richiesta per valutare

- Paziente con diagnosi di malattia autoimmune già fatta, da seguire in gravidanza
- Paziente con patologia della riproduzione che deve essere studiata per identificare una eventuale patologia autoimmune sottostante. In tal caso l'indagine va focalizzata su

quale patologia della riproduzione studiare e quale patologia autoimmune cercare.

Definizione degli anticorpi anti NOS

Sono molecole anticorpali non organo specifici, dirette contro componenti intra cellulari della cellula (nucleo, DNA, mitocondrio, microsoma), contro componenti della muscolatura liscia, contro i fosfolipidi della membrana cellulare.

Sono responsabili di associazione con diverse patologie della gestazione interrompendo il normale meccanismo di duplicazione cellulare o favorendo eventi trombotici e di occlusione vascolare.

Sono presenti in popolazioni di pazienti sane senza patologia autoimmune o della riproduzione, è importante infatti ricordare che la presenza o

la positività dei test autoanticorpali è solo un tassello del quadro clinico generale.

Laboratorio e test di auto immunità

Va sottolineato come ogni laboratorio può fornire risultati differenti da altri laboratori e che i kit di valutazione utilizzati possono avere differenze di sensibilità e di specificità tra di loro. Pertanto la positività di un test va valutata con attenzione ed eventualmente ripetuta prima di indirizzare diagnosi e applicazioni cliniche e terapeutiche. In generale la politica sanitaria che viene spesso utilizzata è quella di cercare auto anticorpi 'a tappeto' ma è invece importante indirizzare la ricerca verso gli anticorpi che possono essere collegati al quadro clinico da indagare.

Anticorpi anti nucleo (ANA)

Questo termine si riferisce a diversi gruppi di autoanticorpi diretti contro antigeni del nucleo e del citoplasma. Gli antigeni sono comuni a tutte le cellule nucleate e svolgono funzioni di trascrizione o traslazione del meccanismo di divisione cellulare o come proteine strutturali nel ciclo cellulare.

La nomenclatura degli ANA è complessa. Gli antigeni sono identificati sulla base di

- struttura chimica (doppia elica del DNA)
- associazione con la malattia (SS-A e SSB nella sindrome di Sjogren)
- individui in cui sono stati descritti per la prima volta (Ro, La, Sm)
- localizzazione citologica (nucleolo, centromero)
- le particelle dove l'antigene è stato trovato (U1, RNP).

La nomenclatura è resa ancora piu' complicata da alcuni antigeni che hanno piu' di un nome (Ro e La sono noti anche come SS-A e SS-B rispettivamente) e molti degli autoanticorpi sono noti dal loro modello di evidenziazione in immuno fluorescenza indiretta (pattern omogeneo o frammentato)

Anticorpi contro la doppia elica del DNA (double-stranded DNA)

Gli anticorpi contro dsDNA sono fortemente associati al lupus eritematoso sistemico, essendo elevate concentrazioni di questo anticorpo ritrovate nel 60% circa dei pazienti con LES. La loro concentrazione è utile sia per la prognosi sia per il monitoraggio di pazienti affetti da LES con misurazioni sieriche ogni 8-12 settimane.

Anticorpi contro antigeni nucleari estraibili (ENA)

Sono un gruppo di anticorpi che fuoriescono dalla parete cellulare quando estratti con soluzione salina. Sono presenti molte componenti antigeniche all'interno del nucleo ma solo un piccolo numero di essi rivestono una reale utilità clinica. In generale esiste una ridotta associazione tra la concentrazione di ENA e la severità della malattia, e bassa correlazione tra la fluttuazione degli auto anticorpi nel tempo.

Anti SS-A (Ro) and Anti SS-B (La)

L'antigene SS-A consiste di due proteine di 52 e 60 kDa (chiamate Ro52 e Ro60, rispettivamente).

Gli anticorpi (principalmente del tipo IgG) contro l'antigene Ro52 appaiono spesso in associazione con gli anticorpi contro l'antigene Ro60 e poche tecniche possono con certezza differenziare tra gli auto anticorpi dei due antigeni differenti. Gli anticorpi anti Ro52 sono piu' frequentemente individuati in pazienti con la sindrome di Sjogren mentre anti Ro60 sono maggiormente frequenti nei soggetti affetti da LES. La loro identificazione è una componente importante nella identificazione dei pazienti con questo sospetto clinico. Sono infatti presenti nel 35% dei pazienti con LES e possono essere associati con lupus neonatale e con blocco atrioventricolare fetale parziale o totale. Le IgG attraversano la placenta nel II e nel III trimestre di gestazione: gli anticorpi anti SS-A attraversano la placenta ed interagiscono con le fibre di conduzione intracardiache fetali distruggendole e determinando un blocco atrio ventricolare fetale in utero

Proteine Anti-ribonucleari (RNP)

L'antigene RNP è pleiomorfico con tre proteine da 70, 33 e 22 kDa legate con vari frammenti di RNA. La definizione di questo complesso è variabile e puo' essere indicato con vari nomi U1-RNP, nRNP, snRNP, U-snRNP e U1-snRNP tutti dati allo stesso antigene. Gli auto anticorpi anti ribonucleari mostrano una elevata specificità per le malattie del tessuto connettivo in cui possono presentarsi come gli unici autoanticorpi.

Anticorpi anti nucleolo

La presenza di positività alle tecniche di immunofluorescen-

za nella zona nucleolare è associata con miosite, fibrosi polmonare e generalmente collegata ad una buona prognosi.

Anticorpi anti centromero

Autoanticorpi contro le proteine del centromero dei cromosomi sono state descritte nel 1980 e sono dirette contro degli epitomi trovati nel core del centromero. Sono stati descritti nella forma cutanea della sclerosi sistemica, nel LES e nella sindrome di Sjogren. In pazienti con fenomeno di Raynaud la loro presenza suggerisce un aumentato rischio di sviluppare una malattia reumatica. Sono stati individuati nel 20% dei pazienti in cui la cirrosi epato biliare primaria puo' essere la prima manifestazione della sclerosi sistemica.

Anticorpi anti citoplasma dei neutrofilii (ANCA)

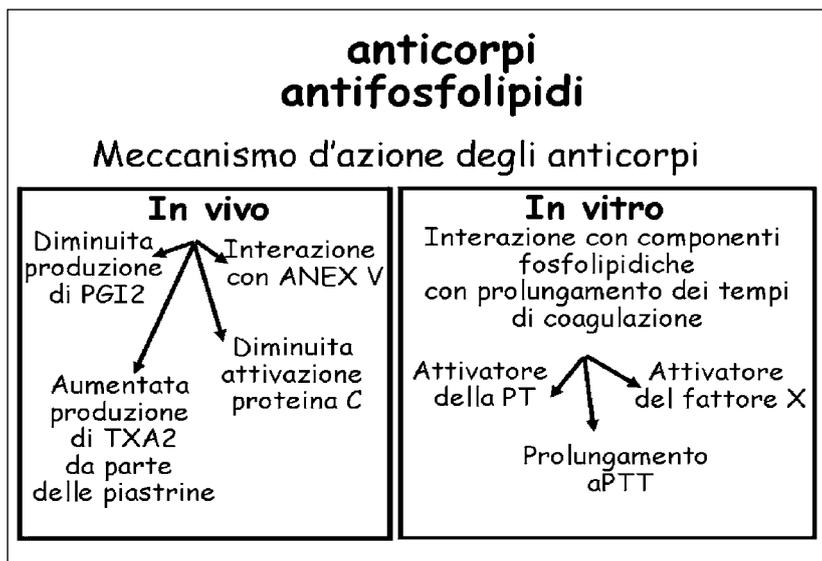
La funzione dei neutrofilii è di ingerire e distruggere antigeni. Sono perciò pieni di enzimi potenti e dannosi come le proteinasi III (PR3), le mieloperoxidasi e le elastasi. Gli anticorpi contro questi enzimi neutrofilii sono stati descritti in associazione con vasculiti sistemiche primarie. Questi disordini eterogenei sono caratterizzati da una diffusa infiammazione della parete vascolare, e la loro classificazione è basata su ritrovamenti clinici ed istologici. In immunofluorescenza si possono identificare due tipi di positività autoanticorpale un pattern granulare citoplasmatico ed un pattern perinucleare. Questi sono ora noti convenzionalmente come il pattern c-ANCA e p-ANCA.

Anticorpi anti cardiolipina e anticorpi alla beta 2-glicoproteina 1

Il termine anti corpi anti fosfolipidi è usato per identificare una varietà di differenti antigeni antifosfolipidi includendo la cardiolipina e la fosfatidilserina (carica negativa) e la fosfatidil colina e la fosfatidiletanolamina (carica neutra). La Beta2glicoproteina (b2GP1) è la piu' importante proteina legante dei fosfolipidi e gli anticorpi anticardiolipina si legano agli epitomi di questa proteina piuttosto che alla cardiolipina stessa.

Il meccanismo della attività degli anticorpi anti fosfolipidi è differente in vitro ed in vivo come illustrato nello schema, ma puo' in definitiva portare a meccanismi di attivazione locale della coagulazione, microtrombi e danno del microcircolo. Conseguenze cliniche della loro presenza sono incidenza elevata di aborto ricorrente e patologia placentare diffusa (Figura 1).

Figura 1



RP

Complicanze materne della sindrome da aPL

La presenza di anticorpi antifosfolipidi è considerata una forma di trombofilia autoimmune caratterizzata da una combinazione di differenti manifestazioni cliniche includendo trombosi venose ed arteriose, trombocitopenia, aborto ricorrente. L'ipercoagulabilità della gestazione rende queste pazienti ad alto rischio di trombosi periferica.

Complicanze fetali della presenza di anticorpi antifosfolipidi in gravidanza

La associazione tra aPL e aborto ricorrente è ben nota, con perdite del secondo trimestre particolarmente comune. La fetal loss rate in aPL primario è riportata essere circa il 50-75%. Nelle gravidanze che non terminano in aborto o perdite fetali esiste una elevata incidenza di preeclampsia ad insorgenza precoce, di ridotta crescita del feto, distacco placentare e parto pretermine iatrogeno. (Figura 2)

Figura 2



L'antigenicità della beta 2 glicoproteina 1

Durante gli ultimi 10 anni diversi gruppi hanno dimostrato che la B2GP1 è effettivamente l'antigene per gli anticorpi anticardiolipina. Sia gli anticorpi antifosfolipidi (aPL) sia il loro antigene B2GP1 sono liberi nel sangue circolante, e queste due entità possono coesistere senza formare complessi immuni che sono eliminati dalla circolazione. Questo meccanismo avviene poiché la B2GP1 diventa antigenica per gli aPL solo quando è immobilizzata su una adeguata superficie caricata negativamente. Questo meccanismo è stato postulato perché il legame tra B2GP1 e superfici negative potrebbe indurre una modificazione conformazionale della proteina rivelando dei neoepitopi a cui gli aPL si possono legare, o aumentando la densità antigenica favorendo il legame con aPL. Questo può inoltre spiegare il motivo per cui pazienti con aPL positivi non hanno alcuna manifestazione di malattia per anni ed all'improvviso vanno incontro a fenomeni di trombosi periferica o di morte fetale senza alcun cambiamento della concentrazione ematica dei livelli di aPL. La fosfatidilserina è probabilmente la superficie su cui la B2GP1 è immobilizzata in vivo. La fosfatidilserina è tuttavia abitualmente localizzata nella parte interna del doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare. Normalmente, se si considera la membrana di una cellula endoteliale esposta agli anticorpi antifosfolipidi circolanti, la fosfatidilserina non è presente nella parte esterna della membrana cellulare: in tal modo non c'è una superficie favorevole per l'immobilizzazione della B2GP1 e non si forma il complesso con gli aPL. Nel momento in cui la superficie cellulare è attivata, e la cellula danneggiata o apoptotica, la fosfatidilserina è traslocata sulla superficie esterna della membrana cellulare dove è esposta alla circolazione sanguigna consentendo l'immobilizzazione della B2GP1 che diventa antigenica per gli

aPL. Il legame che si forma determina il danno vascolare locale che è alla base della patologia riproduttiva.

Durante la gravidanza il trofoblasto induce notevoli rimodellamenti tissutali e la fosfatidilserina può essere esposta alla parte esterna della membrana cellulare come è stato dimostrato in vitro.

L'invasione trofoblastica può pertanto essere un meccanismo alla base della attivazione degli aPL circolanti, e questo meccanismo può spiegare l'elevata incidenza di pazienti con positività degli aPL che mostrano nella loro vita solo complicanze vascolari della gestazione ma non hanno nessuna altra manifestazione della sindrome da anticorpi antifosfolipidi. La sequenza dell'hCG è prodotta dal sinciziotrofoblasto ed è stato dimostrato che aPL possono inibire la secrezione di hCG in vitro, oltre ad impedire e rallentare la differenziazione del trofoblasto in sinciziotrofoblasto.

Meccanismo del legame tra aPL e B2GP1.

La fosfatidilserina esternalizzata sulla superficie esterna della membrana dal meccanismo di danno cellulare o per impianto trofoblastico favorisce una superficie negativamente caricata per l'adesione con la B2GP1. Questo legame consente il contatto tra B2GP1 e aPL con danno della membrana successivo.

In quali pazienti cercare gli anticorpi anti nos?

- Le pazienti con diagnosi di malattia autoimmune
- Tutte le pazienti con abortività ricorrente
- Tutte le pazienti con pregressa patologia gravidica da disfunzione endoteliale o danno multisistemico
- Poor reproducers --- IVF?

È importante raccomandare che la richiesta di verifica degli anticorpi anti nos sia motivata da una ragione clinica e che vi sia un razionale alla base della richiesta. Non va infatti dimenticato che il 5-8% di pazienti con gravidanza normale mostra comunque una positività anticorpale senza segni clinici di malattia. Questi valori raggiungono livelli del 25-30%

nelle pazienti che presentano complicanze gestazionali quali preeclampsia severa. In una valutazione di screening, non è conveniente fare una verifica a tappeto delle pazienti a basso rischio, mentre appare prudente valutare le pazienti che presentano nella loro storia elementi di abortività ricorrente o di sospetto di danni vascolari connessi alla evoluzione della gestazione (preeclampsia, morte intrauterina del feto) in cui sia connessa o sospettata una disfunzione endoteliale.

Allo stesso modo tutte le persone che vanno incontro ad un intervento di fecondazione in vitro possono essere screenate per evitare di incorrere in rischi gestazionali inattesi ed evidenziabili sulla base della presenza di anticorpi NOS.

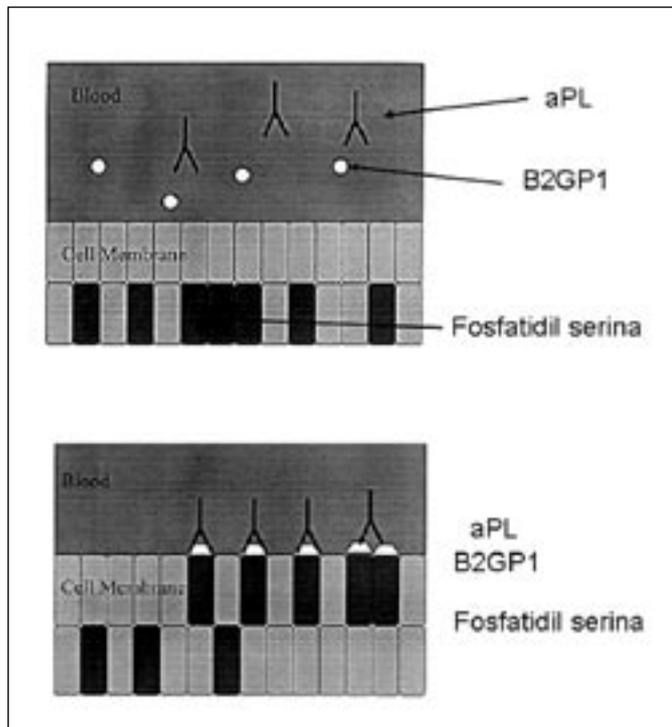
Terapia delle pazienti con anti nos positivi.

Diverse review sono presenti in letteratura sulla possibilità terapeutiche delle pazienti con anticorpi anti nos. I presidi terapeutici utilizzati vanno dall'aspirina a basse dosi, al cortisone, all'eparina a basso peso molecolare.

Meccanismo di azione dell'eparina

Eparina è somministrata alle donne con aPL basandosi sull'assunzione che gli autoanticorpi determinano complicanze della gravidanza attraverso un meccanismo trombotico. Al di là delle proprietà anticoagulanti l'eparina è nota per legare le citochine ed i fattori di crescita come il VEGF che è ritenuto essere importante per mantenere la gravidanza. La attività biologica delle citochine è modificata dall'eparina: l'invasività del trofoblasto, ridotta in vitro dalla presenza di aPL può essere restaurata e recuperata dalla presenza di eparina. Allo stesso modo l'eparina è in grado di ripristinare il meccanismo di trasformazione del trofoblasto verso il

Figura 3



sinciziotrofoblasto che è interrotto o alterato dalla presenza degli anticorpi antifosfolipidi. Tra i vari meccanismi d'azione, l'inibizione del legame tra aPL e fosfolipidi sembra essere fondamentale per l'effetto terapeutico dell'eparina: in tal modo impedisce la formazione del legame B2GP1/fosfolipidi/aPL che induce le complicanze della gestazione. L'eparina condividerebbe il sito di legame sulla molecola della B2GP1 con i fosfolipidi: la sua presenza inibirebbe pertanto il legame con i fosfolipidi e la formazione del complesso con la B2GP1. Successivamente al legame con l'eparina la B2GP1 circolante sarebbe maggiormente suscettibile alla azione di clivaggio da parte della plasmina circolante. Una volta legata alla plasmina circolante, la B2GP1 avrebbe minore capacità di legarsi ai aPL. Pertanto sia per azione diretta sulla molecola della B2GP1, sia per azione indiretta attraverso la plasmina, l'eparina riuscirebbe ad impedire il nefasto legame della B2GP1 con gli aPL circolanti, riducendo il rischio della formazione dei microtrombi e del danno endoteliale diffuso.

BIBLIOGRAFIA RACCOMANDATA PER APPROFONDIMENTO

1. Aoki K., Dudkiewicz A., Matsuura E., Novotny M., Kaberlein G., Gleicher N. Clinical significance of P₁-glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies in the reproductive autoimmune failure syndrome: Correlation with conventional antiphospholipid antibody detection systems *Am J Obstet Gynecol*; 172:926-31, 1995
2. Balasch J. Antiphospholipid antibodies: a major advance in the management of recurrent abortion *Autoimmunity Rev.* 3, 228-233, 2004
3. Bats A., Lejeune E., Cynober V., Safar E., Gonzales M., Milliez J., Carbonne B. Antiphospholipid syndrome and second- or third-trimester fetal death: follow-up in the next pregnancy *Europ. J. Obstet. Biol. Reprod.* 114, 125-129, 2004
4. Bianchi D.W. Fetomaternal cell traffic, pregnancy-associated progenitor cells, and autoimmune disease *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 18, 6, 959-975, 2004
5. Blétry O., Molina V., Somogyi A. Surveillance biologique des pathologies auto-immunes pendant la grossesse *Biological monitoring of auto-immune diseases during pregnancy Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 31, 151-156, 2003
6. Carp H. Medical management of recurrent miscarriage—evidence-based approach *International Congress Series* 1266, 328-334, 2004
7. Castellino G., Khamashta M., Hughes G. The antiphospholipid syndrome *European Journal of Internal Medicine* 10, 191-197, 1999
8. Cerveraa R., Fonta J., Carmonab F., Balaschb J.: Pregnancy outcome in systemic lupus erythematosus: good news for the new millennium *Autoimmunity Reviews* 354-359, 2002
9. Cerveraa R., Ashersonb R. Clinical and epidemiological aspects in the antiphospholipid syndrome. *Immunobiol.* 207, 5 11, 2003
10. Chamley L.W Antiphospholipid antibodies: biological basis and prospects for treatment *J. Reprod. Immunol.* 57, 185-202, 2002
11. Chena Q., Stone P.R., Woonb S., Chingb L., Hungb S., . McCowana L., Chamleya L.W Antiphospholipid antibodies bind to activated but not resting endothelial cells: is an independent triggering event required to induce antiphospholipid antibody-mediated disease? *Thromb. Res.* 114, 101-111, 2004
12. Coulam CB, Roussev R. Chemical pregnancies: immunologic and ultrasonographic studies. *AJRI* 2002; 48:323-328,2002
13. Di Simone N., Cialiandro D., Castellani R., Ferrazzani S., Caruso A. Interleukin-3 and human trophoblast: in vitro explanations for the effect of interleukin in patients with antiphospholipid antibody syndrome *Fertil Steril* 73:1194-1200, 2000
14. Di Simone N., Castellani R., Calandro D., Caruso A. Antiphospholipid antibodies regulate the expression of trophoblast cell adhesion molecules *Fertil Steril* 77:805-11. 2002

15. Geva E, Amit A, Lerner-Geva L, Yaron Y, Daniel Y, Schwartz T, Azem F, Yogel I, Lessing JB. Prednisone and aspirin improve pregnancy rate in patients with reproductive failure and autoimmune antibodies: A prospective study. *AJRI* ; 43:36-40 , 2000
16. Gordon C., *Pregnancy and autoimmune diseases Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 18, 3, 359-379, 2004
17. Kikuchi K, Shibahara H, Hirano Y, Kohno T, Hirashima C, Suzuki T, Takamizawa S, Suzuki M. Antinuclear antibody reduces the pregnancy rate in the first IVF-ET treatment cycle but not the cumulative pregnancy rate without specific medication. *AJRI* 2003; 50:363-367, 2003
18. Lakasing L, Williamson C. *Obstetric complications due to autoantibodies Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 19, 1, 149-175, 2005
19. Matthiesena L., Berga G., Ernerudhb J., Skogbc T. *A prospective study on the occurrence of autoantibodies in low-risk pregnancies Europ. J. Obstet. Biol Reprod.* 83: 21-26, 1999
20. Meroni P., Raschi E., Camera M., Testoni C., Nicoletti F., Tincani A., Khamashta M., Balestrieri G., Tremoli E., Hess D. *Endothelial Activation by aPL: A Potential Pathogenetic Mechanism for the Clinical Manifestations of the Syndrome Journal of Autoimmunity* 15, 237-240, 2000
21. Pandey M. K, Reena Rani E., Agrawal S *An update in recurrent spontaneous abortion Arch Gynecol Obstet* 272: 95-108, 2005
22. Poston L., Raijmakers M. *Trophoblast Oxidative Stress, Antioxidants and Pregnancy Outcome—A Review Placenta* 25, Supplement A, *Trophoblast Research*, Vol. 18, S72-S78, 2004
23. Quenby S., Mountfield S., Cartwright J., Whitley G., Chamley L. Vince G. *Antiphospholipid antibodies prevent extravillous trophoblast differentiation Fertil Steril* 83:691- 8, 2005.
24. Raj R. *Obstetric Management of Antiphospholipid Syndrome J. Autoimmunity* 15, 203-207, 2000
25. Regan L., Raj R. *Thrombophilia and pregnancy loss J. Reprod. Immunol.* 55 163-180, 2002
26. Sheldon J. *Laboratory testing in autoimmune rheumatic diseases Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 18, 3, 249-269, 2004
27. Sibilia J. *Antiphospholipid syndrome: why and how should we make the diagnosis? Joint Bone Spine* 70 97-102, 2003
28. Stern C., Chamley L., Hale L., Kloss M., Baker G. *Antibodies to b2 glycoprotein I are associated with in vitro fertilization implantation failure as well as recurrent miscarriage: results of a prevalence study Fertil Steril* 70, 938-944, 1998
29. Stern C., Chamley L., Norris H., Hale L., Baker H.W. *A randomized, double-blind, placebo controlled trial of heparin and aspirin for women with in vitro fertilization implantation failure and antiphospholipid Fertil. Steril.* 80 376-383, 2003
30. Tincani A., Biasini Rebaiolia C., Frassia M., Taglietti M. *et al Pregnancy Study Group of Italian Society of Rheumatology Pregnancy and autoimmunity: Maternal treatment and maternal disease influence on pregnancy outcome Autoimmunity Reviews* 4, 423- 428, 2005
31. Vinatier D., Dufour P, Cossou M., Houpeau JL *Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriages Europ. J. Obstet. Biol Reprod.* 96,37-50, 2003