

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI
DIPARTIMENTO DI MEDICINA, CHIRURGIA E ODONTOIATRIA
CORSO DI DOTTORATO IN METODOLOGIA CLINICA
CICLO XXII

MARCATORI DI SEVERITÀ DI MALATTIA NEI SOGGETTI CON ANGIOEDEMA DA
CARENZA DI C1 INIBITORE

Tesi di: Chiara Suffritti

Matr.: R06911

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Marco Cattaneo

Tutor: Chiar.mo Prof. Marco Cicardi

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

| | |
|---|--------|
| INTRODUZIONE | pag.2 |
| C1 inibitore | pag.3 |
| Sistema del complemento | pag.6 |
| Sistema di contatto | pag.8 |
| Chininogeni | pag.9 |
| Angioedema | pag.11 |
| Angioedema ereditario | pag.11 |
| Angioedema acquisito | pag.12 |
| Altre forme di angioedema | pag.13 |
| Manifestazioni cliniche dell'angioedema da carenza di C1-INH | pag.13 |
| Diagnosi | pag.14 |
| Trattamento | pag.16 |
| | |
| SCOPO DEL LAVORO | pag.20 |
| | |
| MATERIALI E METODI | pag.22 |
| | |
| RISULTATI | pag.25 |
| | |
| DISCUSSIONE | pag.41 |
| | |
| RIASSUNTO | pag.45 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA | pag.49 |

INTRODUZIONE

Il C1 inibitore (o inibitore della C1 esterasi, C1-INH) è un inibitore delle proteasi seriniche (SERum Protease INhibitors, SERPIN) che blocca l'attività di C1r, C1s, MASP-1 e MASP-2 nel sistema del complemento, fattore XII e callicreina nel sistema di contatto, fattore XI e trombina nel sistema della coagulazione, attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) e plasmina nel sistema fibrinolitico [1] (Fig.1). La carenza di C1-INH causa edemi mucocutanei ricorrenti e può essere ereditaria (angioedema ereditario, AEE) o acquisita (angioedema acquisito, AEA), patologie che hanno lo stesso quadro clinico caratterizzato da angioedema a livello di cute, tratto gastrointestinale e laringe. A seconda del sito interessato, i pazienti vanno incontro a edema sottocutaneo deformante, dolore addominale, vomito e/o diarrea, disfagia e disfonia fino ad asfissia nel caso di edema della laringe o della faringe.

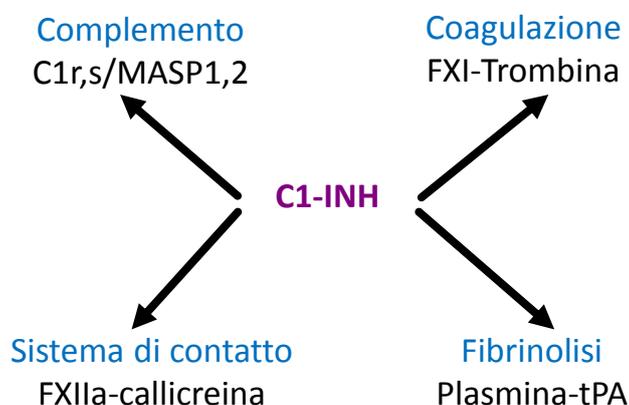


Fig.1 Schema delle funzioni del C1 inibitore

C1 INIBITORE

Il C1 inibitore è una glicoproteina a singola catena, caratterizzata da un dominio “serpinico” C-terminale e da un dominio non serpinico N-terminale [2]. Quest’ultimo è costituito da 113 aminoacidi e non presenta omologie con altre serpine [3]. Il dominio serpinico invece comprende 365 aminoacidi [4] ed è connesso al dominio N-terminale da due ponti disolfuro, il primo tra il residuo di cisteina 101 e la cisteina 406, il secondo tra la cisteina 108 e quella 183. Il C1 inibitore ha un peso molecolare apparente di 105 KDa [5] ed una concentrazione plasmatica di 24mg/100ml. Attraverso studi di immunofluorescenza delle cellule parenchimali epatiche, utilizzando anticorpi anti-C1-INH è stato dimostrato che la sede principale di sintesi del C1-INH è il fegato. Altri siti di produzione sono la placenta, i megacariociti, i fibroblasti ed i monociti [1].

Il C1 inibitore ha un alto contenuto di carboidrati (33-35%) [6], di conseguenza il suo peso molecolare risulta superiore rispetto a quello che ci si attenderebbe per una proteina di 478 aminoacidi. E’ caratterizzato da 6 carboidrati N-linked. Inoltre l’analisi della sequenza ha rivelato 14 siti potenziali di O-glicosilazione [2], 7 dei quali sono stati verificati tramite analisi dei carboidrati [7]. La maggior parte degli zuccheri sono presenti nel dominio N-terminale della proteina, e non influenzano la sua funzione inibitoria [6,8]; viceversa l’affinità per endotossine e selectine sembra dipendere dagli N-glicani. La regione C-terminale è essenziale per la capacità di inibizione della proteina ed ha una struttura omologa a quella delle altre serpine [9], quali l’ α_1 -antitripsina, l’antitrombina III, l’ α_2 -antiplasmina e il cofattore eparinico II. La famiglia delle serpine costituisce una classe di proteine altamente conservate nel corso dell’evoluzione, la cui funzione primaria è la regolazione dell’attività delle proteasi seriniche. Le serpine sono definite “inibitori suicidi”, che funzionano come una trappola per topi. Esse condividono una struttura terziaria caratterizzata da 3 β -sheet (A, B, C) e 9 α -eliche (da A ad D) [10]. Inoltre presentano un “reactive site loop”, un loop peptidico flessibile posizionato al di

fuori del β -sheet centrale, libero di interagire con le proteasi bersaglio. Residui chiave del loop sono i cosiddetti residui P1 e P1', che sono localizzati uno accanto all'altro e costituiscono un'"esca" per le proteasi bersaglio. Dopo il taglio del legame tra P1 e P1' da parte della proteasi bersaglio, il reactive site loop è tirato all'interno del β -sheet centrale: da ciò deriva un drammatico cambiamento conformazionale. Il residuo P1 del sito reattivo, di conseguenza, mentre è ancora legato covalentemente al sito attivo della proteasi serinica, viene spostato al polo opposto della molecola [11] (Fig.2). Una volta spostato al polo opposto della serpina, il sito catalitico della proteasi è significativamente disturbato e non è più in grado di completare l'idrolisi necessaria per scindere il legame tra la serina del proprio sito attivo e il residuo P1. Ciò rende probabilmente la proteasi non solo inattiva, ma anche più suscettibile all'attacco proteolitico. [12] Il complesso serpina-proteasi è rapidamente degradato, infatti. Nel caso del C1 inibitore l'emivita della clearance dal plasma dei complessi con varie proteasi è compresa tra 20 e 47 minuti [13,14].

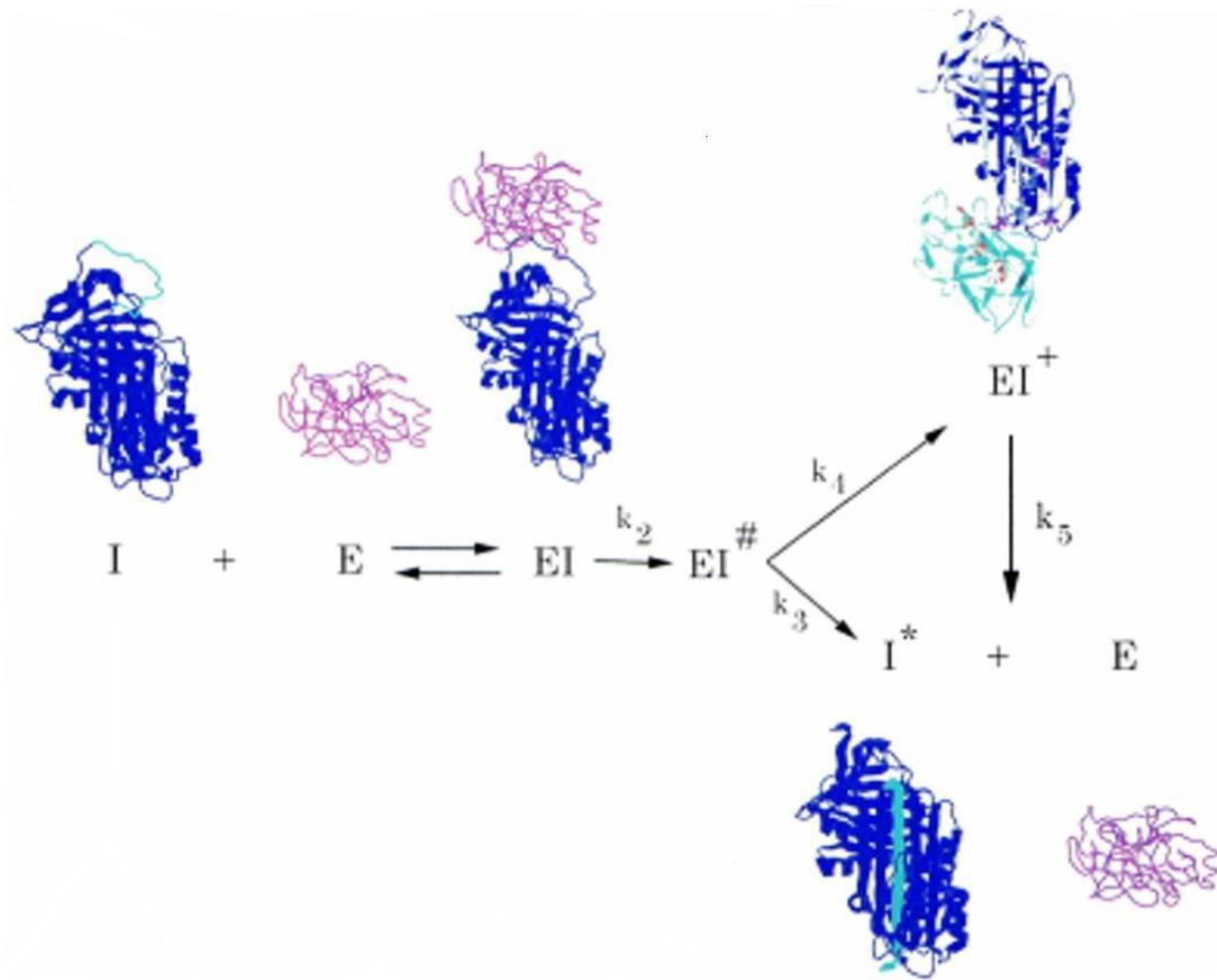


Fig.2 Meccanismo di inibizione delle proteasi (E) da parte delle serpine (I), illustrato utilizzando α_1 -antitripsina come serpina e la tripsina come proteasi. La serpina e la proteasi si legano per formare un complesso iniziale non covalente (EI). Il clivaggio avviene con costante di velocità k_2 e porta alla formazione dell'intermedio $EI^\#$. Esiste una competizione tra il pathway inibitorio (con costante di velocità k_4) e il pathway del substrato (costante di velocità k_3). Il completamento della reazione di substrato risulta nel rilascio della serpina clivata (I^*) e della proteasi libera. Il pathway di inibizione porta alla formazione del complesso covalente (EI^+). In vivo i complessi vengono degradati prima che una dissociazione apprezzabile (costante di velocità k_5) possa avvenire (da Gettins PG, *Genome Research* 2000;10:1833-1835).

SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Il sistema del complemento consiste di più di 30 proteine collegate in tre cascate biochimiche: via classica, via alternativa e via della MBL (Mannan-Binding Lectin) (Fig.3). Il ruolo principale svolto da questo sistema è quello di riconoscere e promuovere l'eliminazione, mediante fagocitosi, di microorganismi o cellule danneggiate [15,16,17]. La via classica è attivata solitamente quando un complesso di antigene e immunoglobulina M (IgM) o anticorpo IgG si lega alla prima componente del complemento, C1. C1 attivato cliva sia C4 che C2, per generare C4a e C4b, e C2a e C2b rispettivamente. I frammenti C4b e C2a si combinano per formare la C3 convertasi classica, che taglia C3 in C3a e C3b. Il legame di C3b alla C3 convertasi porta alla formazione della C5 convertasi, che cliva C5 in C5a e C5b: quest'ultimo diventa parte del complesso di attacco alla membrana (MAC, membrane attack complex) [18].

La via alternativa del sistema del complemento è stimolata dalle superfici microbiche e da una varietà di polisaccaridi complessi. C3b, generato da clivaggio spontaneo, può legarsi alle superfici cellulari e forma un complesso con il fattore B che è successivamente tagliato dal fattore D. La C3 convertasi alternativa che ne risulta è stabilizzata dal legame con la properidina. Il clivaggio di C3 e il legame di una molecola aggiuntiva di C3b alla C3 convertasi origina la C5 convertasi. Quest'ultima cliva C5 per produrre C5a e C5b. Quindi C5b si lega sequenzialmente a C6, C7 e C8 per formare C5-b8 che catalizza la polimerizzazione di C9 a costituire il complesso di attacco alla membrana. Quest'ultimo si inserisce nelle membrane bersaglio e causa la lisi cellulare [19,20].

La via MBL (Mannan-Binding Lectin) è stimolata dal legame di MBL ai polisaccaridi di vari microbi [21]. Successivamente, MBL stimola l'attivazione di MASP-1 (MBL-associated serine protease-1) e MASP-2. MASP-1 e MASP-2 possono attivare C4, portando alla stimolazione della via classica.

I peptidi C3a, C4a e C5a sono noti come anafilossine [22]. Esse mediano diverse risposte nella reazione infiammatoria, come la contrazione della muscolatura liscia, cambiamenti nella permeabilità vascolare, rilascio di istamina dalle mast cells, chemiotassi nei confronti di mast cells e neutrofili ed attivazione piastrinica. [22,23,24,25]. Le anafilossine sono rapidamente inattivate dalla carbossipeptidasi N [26].

L'attivazione della via classica del complemento è regolata dal C1 inibitore. Il C1 inibitore è il solo inibitore noto delle proteasi seriniche C1s e C1r della via classica del complemento [27,28].

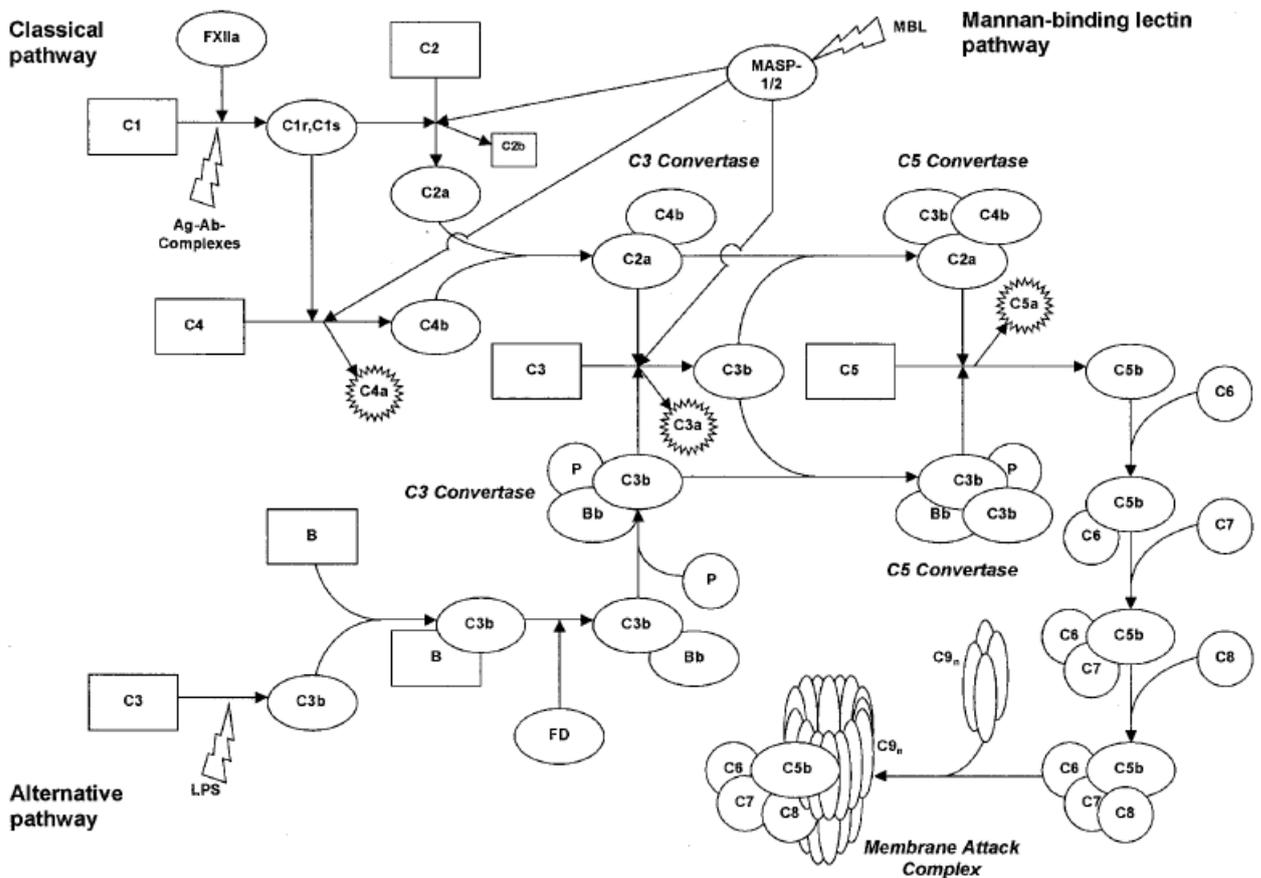


Fig.3 Sistema del complemento (da Caliezi et al., *Pharmacological Reviews*, 2000;52:91)

SISTEMA DI CONTATTO

Il fattore XII (FXII), la precallicreina (PK) e il chininogeno ad alto peso molecolare (HK) costituiscono il sistema di contatto, così chiamato in quanto in vitro è richiesto il contatto con superfici cariche negativamente (es. caolino) per l'attivazione degli zimogeni [29]. Questo sistema è attivato quando FXII, precallicreina e HK si complessano a livello della membrana cellulare [30]. Tuttavia, il meccanismo di attivazione del sistema di contatto in vivo rimane poco chiaro. Recentemente è stato dimostrato che l'enzima di membrana proilcarbossipeptidasi (PRCP) e/o la proteina HSP90 possono attivare la precallicreina legata a superfici di cellule endoteliali [31,32].

Evidenze sperimentali dimostrano che la bradichinina (BK) è il peptide che aumenta la permeabilità vascolare che causa l'edema locale responsabile dei sintomi clinici di angioedema ereditario [33]. Il meccanismo di generazione della bradichinina passa attraverso il clivaggio in due siti del chininogeno ad alto peso molecolare da parte della callicreina plasmatica priva della sua proteina regolatrice (C1-INH) (Fig.4) [34]. Recentemente è stato dimostrato [35] che anche la proteasi MASP-1 (mannose binding lectin associated serine protease) è in grado di tagliare l'HK con il rilascio di bradichinina. Dal momento che il C1 inibitore inibisce l'attività delle MASPs, è probabile che l'azione di MASP-1 sul chininogeno ad alto peso molecolare contribuisca a dare gli elevati livelli di bradichinina caratteristici dei pazienti affetti da angioedema ereditario.

Sulla superficie di cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVECs) sia l'HK che l'HK clivato si legano alle proteine di membrana uPAR (urokinase Plasminogen Activator Receptor) [36], gC1qR (globular C1q receptor) [37] e citocheratina 1 (CK1) [38]. Pixley e colleghi [39] hanno dimostrato che il ruolo di CK1 e gC1qR è probabilmente quello di legare l'HK alla superficie della membrana prima che avvenga il clivaggio del chininogeno, mentre uPAR potrebbe essere la proteina capace di discriminare tra forme clivate e non di HK.

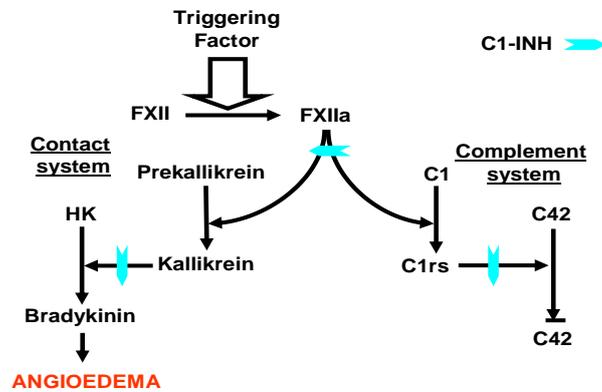


Fig.4 Patogenesi dell'angioedema dovuta a carenza di C1 inibitore. Gli edemi sono causati dall'attivazione del FXII, che a sua volta genera callicreina plasmatica attiva. Quest'ultima cliva il chininogeno ad alto peso molecolare liberando bradichinina. La bradichinina causa un aumento di vasopermeabilità e conseguente edema.

CHININOGENI

I chininogeni sono stati descritti come le proteine plasmatiche da cui, in seguito all'azione di proteasi, vengono rilasciati i peptidi bradichinina (BK) e lisil-bradichinina (Lys-BK) [40]. Nel 1967, due forme di chininogeni plasmatici umani vennero identificati da Jacobsen e Kriz [41]: il chininogeno a basso peso molecolare (low-molecular-weight kininogen, LK) e il chininogeno ad alto peso molecolare (high-molecular-weight kininogen, HK). Entrambi sono substrati per il rilascio proteolitico di lisil-bradichinina e di bradichinina da parte della callicreina tissutale e plasmatica rispettivamente. Il chininogeno ad alto peso molecolare è un polipeptide con un peso molecolare di 120 kDa e una concentrazione plasmatica di 80 µg/ml (670 nM). Il chininogeno a basso peso molecolare ha invece una concentrazione plasmatica di 60 µg/ml e un peso molecolare di 68 kDa.

Sia l'HK che l'LK sono codificati dallo stesso gene, presente in singola copia [42] sul cromosoma 3 (3q27). Il gene è lungo 27 kb e consiste di 11 esoni, i cui trascritti primari sono modificati in maniera differenziale a dare due diversi RNA. Il chininogeno a basso peso molecolare contiene i primi 9 esoni più una parte del decimo comprendente i codoni per la bradichinina e 12 aminoacidi aggiuntivi; viene poi giunto l'undicesimo esone. L'HK contiene gli stessi nove esoni e il decimo esone per tutta la sua lunghezza.

La forma matura dell'HK contiene 626 aminoacidi (Fig.5). In seguito al clivaggio da parte della callicreina, viene rilasciato il nonapeptide bradichinina dal dominio D4, corrispondente alla parte iniziale del decimo esone. La proteina clivata contiene una catena pesante N-terminale (362 aminoacidi) legata ad una catena leggera C-terminale (255 aminoacidi) mediante un singolo ponte disolfuro. La catena pesante consiste dei tre domini D1, D2 e D3 corrispondenti ai primi 9 esoni ed è identica nell'HK e nell'LK [43].

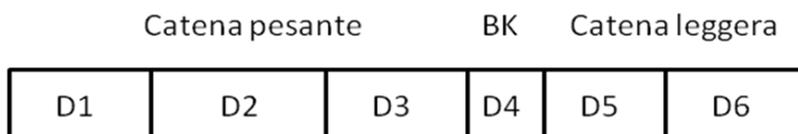


Fig.5 Struttura del chininogeno ad alto peso molecolare.

E' noto che la precallicreina esiste nel plasma come complesso biomolecolare con l'HK [44]. Anche il FXI si lega al chininogeno ad alto peso molecolare e l'associazione dell'HK con la callicreina e il FXI protegge entrambi gli enzimi dagli inibitori plasmatici quali il C1 inibitore e l' α_2 -macroglobulina. La capacità dell'HK di legare gli zimogeni è dovuta al dominio 6 della sua catena leggera [45], mentre il dominio 5 contiene regioni responsabili del legame a superfici cariche negativamente.

ANGIOEDEMA

Angioedema ereditario

Il quadro clinico tipico dell'angioedema ereditario fu descritto per la prima volta nel 1882 da Heinrich Quincke [46]. Nella sua descrizione Quincke usa il termine angioneurotico, utilizzato in seguito per identificare questa specifica malattia, ipotizzando che la causa dell'edema cutaneo fosse un'angioneurosi, "un'alterazione di carattere nervoso della parete vascolare per quanto riguarda la sua capacità di sudorazione, per cui il processo è più simile ad un'inflammazione". Nel 1888 William Osler [47] descrisse per la prima volta, in modo completo, le caratteristiche cliniche della malattia. La carenza di C1 inibitore come causa dell'angioedema ereditario fu identificata solo all'inizio degli anni '60, quando mediante tecniche cromatografiche Pensky et al. [48] isolarono per la prima volta l'inibitore della C1 esterasi. Successivamente fu dimostrata da Donaldson ed Evans la carenza di C1 inibitore nel plasma di individui affetti da angioedema ereditario [49].

L'angioedema ereditario è una malattia genetica con una prevalenza stimata tra 1/10000 e 1/50000 [50], trasmessa con modalità autosomica dominante e in cui il difetto genico risulta in una ridotta sintesi o alterata funzionalità del C1 inibitore. Il gene del C1 inibitore è localizzato sul cromosoma 11 (11q11-q13.1) e consiste di 8 esoni, per una lunghezza complessiva di 17159 bp [51]. Fino ad ora sono state individuate più di 200 mutazioni, raccolte in uno specifico database [52]. E' stato stimato che il 20-25% dei casi di angioedema ereditario risulti da mutazioni *de novo* [53]. Le mutazioni responsabili della carenza di C1 inibitore possono essere suddivise in due gruppi: a) mutazioni che comportano la sostituzione/delezione/inserzione di uno o pochi nucleotidi, e che rappresentano l'85% dei casi; b) grosse delezioni/inserzioni che interessano parti estese del gene e costituiscono il restante 15%. Si ipotizza che tali riarrangiamenti genici siano dovuti a ricombinazione diseguale tra sequenze Alu presenti negli introni [54,55,56]. Le mutazioni del gene del C1 inibitore possono

alterare la normale sintesi proteica a tutti i livelli: si può avere un blocco della trascrizione con impossibilità di formazione dello specifico messaggero, o si possono verificare modificazioni che determinano la sintesi e la secrezione di un prodotto proteico funzionalmente alterato. Responsabili della sintesi di proteine disfunzionali sono principalmente mutazioni puntiformi che causano la sostituzione di un singolo aminoacido in alcune posizioni del loop reattivo (RCL) del C1 inibitore o nel sito reattivo vero e proprio.

Sono stati descritte alcune varianti fenotipiche della patologia: l'angioedema ereditario di tipo 1, che comprende circa l'80-85% dei casi, è definito da concentrazioni plasmatiche ridotte di C1 inibitore (con livelli tra il 5 e il 30% dei valori normali). Le mutazioni che causano l'angioedema ereditario di tipo 1 sono distribuite lungo tutto il gene del C1 inibitore. In contrasto, nell'angioedema di tipo 2 (15-20% dei casi) le mutazioni sono tipicamente singole sostituzioni aminoacidiche localizzate principalmente nell'esone 8, in corrispondenza del sito attivo del C1-INH o vicino ad esso. L'angioedema ereditario di tipo 2 è caratterizzato da livelli plasmatici di C1 inibitore normali, o persino aumentati, ma la proteina secreta risulta essere disfunzionale.

Recentemente è stata descritta un'altra variante di angioedema ereditario (angioedema ereditario di tipo 3) prevalentemente (ma non esclusivamente) in soggetti di sesso femminile. Questo tipo di angioedema non è correlato a carenza di C1 inibitore e una sottopopolazione di pazienti affetti da tale variante presenta una mutazione missense in posizione 309 del gene per il fattore XII (un residuo di treonina è sostituito da una lisina o da una arginina) [57,58,59].

Angioedema acquisito

L'angioedema acquisito è una condizione ancora più rara dell'angioedema ereditario legata frequentemente ad una malattia linfoproliferativa e/o alla presenza di autoanticorpi. È caratterizzato dal consumo del C1 inibitore e, quindi, dall'iperattivazione della via classica del complemento. La presentazione clinica è simile a quella dell'angioedema ereditario ma

elementi caratteristici sono l'assenza di storia familiare, la tardiva comparsa di sintomi (generalmente dopo la quarta decade di vita) e la diversa risposta ai trattamenti [60].

Altre forme di angioedema non allergico

L'angioedema da carenza di C1 Inibitore si presenta tipicamente senza orticaria e va distinto da altre forme di angioedema senza orticaria [61] quali:

- angioedema legato all'assunzione di farmaci, in particolare gli ACE inibitori (lo 0.2% dei pazienti che assume ACEI sviluppano angioedema), estrogeni e FANS
- angioedema legato a punture d'insetto o all'ingestione di particolari alimenti
- angioedema associato ad altra malattia (generalmente infettiva o autoimmune)
- angioedema idiopatico, istaminergico o non istaminergico

MANIFESTAZIONI CLINICHE DELL'ANGIOEDEMA DA CARENZA DI C1-INH

La frequenza e la severità dei sintomi sono altamente variabili tra i pazienti e persino relativamente allo stesso paziente nel corso del tempo. Le manifestazioni cliniche, che nei pazienti affetti da angioedema ereditario insorgono solitamente entro la seconda decade di vita, consistono in angioedemi ricorrenti che interessano il sottocute e/o le mucose dell'apparato gastroenterico o delle alte vie respiratorie. L'orticaria non fa parte del quadro clinico: fugaci rush eritematosi, di solito con aspetto a carta geografica (eritema marginato), possono precedere la comparsa del vero angioedema. L'angioedema cutaneo ha tipicamente un andamento lento: esso provoca una deformazione del distretto colpito che aumenta progressivamente fino a raggiungere l'estensione massima in 12-36 ore e in seguito regredisce completamente in un tempo che varia tra 2 e 4 giorni. Spesso viene interessato un singolo distretto, ma non è infrequente una localizzazione multipla o un andamento migrante. Se

l'angioedema interessa le mucose gastrointestinali si estrinseca in una grave sintomatologia dolorosa, spesso con vomito e (meno frequentemente) diarrea. Talvolta, nel corso degli episodi addominali, che durano nella fase acuta da 12 a 48 ore, non ci sono elementi che consentano una differenziazione certa da un'emergenza chirurgica. L'ecografia di solito mostra un piccolo versamento peritoneale, alla TC addome è possibile vedere l'edema delle anse mentre all'emocromo può essere presente una modesta leucocitosi. L'evenienza più grave rimane, comunque, l'edema laringeo. Presente in più della metà dei soggetti è causa di morte nel 25-30% dei non diagnosticati. Alcuni pazienti, dopo drammatiche esperienze, arrivano a richiedere la creazione di uno stoma con cannula endotracheale permanente che garantisce comunque la sopravvivenza in caso di edema laringeo.

Fattori scatenanti che possono precipitare gli attacchi sono i microtraumi, lo stress, le infezioni e, nelle donne, i cambiamenti ormonali (ciclo mestruale, gravidanza, parto). Molto spesso però gli attacchi si presentano senza nessun apparente fattore scatenante. Alcuni pazienti riconoscono sintomi prodromici di un attacco come l'improvviso cambiamento dell'umore o la comparsa di astenia e malessere generale.

DIAGNOSI

La diagnosi di angioedema da carenza di C1 inibitore, oltre che sulla storia familiare e sulla clinica, si basa sui livelli plasmatici di C1-INH e di C4.

In caso di familiarità negativa si deve considerare la possibilità che si tratti di una mutazione "de novo" oppure di una forma di angioedema da carenza acquisita di C1-INH [53,62].

La malattia è potenzialmente letale in caso di edema della glottide. Inoltre, l'attacco addominale può mimare il quadro di un addome acuto chirurgico. Pazienti con angioedema da carenza di C1 inibitore con un attacco acuto addominale sono stati sottoposti ad interventi di laparotomia non necessari, in alcuni casi anche più di una volta. A tutt'oggi tale patologia resta

ancora frequentemente non diagnosticata e spesso confusa con un angioedema allergico e trattato con antistaminici e cortisonici con scarso successo. Una corretta diagnosi e, quindi, il trattamento precoce degli attacchi acuti porta ad una riduzione della mortalità oltre che ad evitare interventi chirurgici non necessari.

Criteri per la diagnosi di angioedema da carenza di C1 inibitore (da Agostoni et al., [63])

Criteri clinici

1. angioedema sottocutaneo, non pruriginoso, non eritematoso, autolimitantesi, solitamente ricorrente e di lunga durata (più di 12 ore), con nessuna o scarsa orticaria, talvolta preceduto da eruzione cutanea (tipo eritema marginato).
2. dolori addominali ricorrenti (spesso con vomito e/o diarrea) senza altra causa, a risoluzione spontanea in 12-48 ore.
3. edemi ricorrenti laringei
4. storia familiare conclamata di angioedema da carenza di C1 inibitore.

Criteri di laboratorio

1. Livelli antigenici di C1-Inibitore <50% del normale in due determinazioni separate e dopo il primo anno di vita
2. Livelli di attività funzionale di C1-Inibitore <50% del normale in due determinazioni separate e dopo il primo anno di vita
3. Mutazione del gene di C1 inibitore che altera la sintesi e/o la funzionalità della proteina

La diagnosi può essere stabilita in presenza di almeno un criterio clinico e di almeno un criterio di laboratorio.

In presenza del solo criterio clinico 4 e di un criterio di laboratorio, il paziente viene definito “portatore asintomatico”.

E' indicato eseguire il dosaggio di C1 inibitore (antigenico e, se normale, funzionale) nei seguenti casi:

1. Angioedema ricorrente senza orticaria non responsivo ad antistaminici e cortisonici
2. Dolori addominali ricorrenti senza causa apparente
3. Storia familiare di angioedema
4. Storia familiare di carenza di C1 inibitore
5. Angioedema in presenza di bassi livelli di C4

TRATTAMENTO

A causa delle conseguenze invalidanti degli attacchi di angioedema sulle attività lavorativa e della vita quotidiana e del rischio di morte per soffocamento in caso di episodi di edema della glottide, il trattamento è un punto cruciale nella gestione dei pazienti con angioedema da carenza di C1 inibitore.

Le finalità del trattamento sono rivolte a:

1. eliminare la mortalità e ridurre le conseguenze degli eventi acuti (terapia dell'attacco acuto)
2. ridurre gli effetti invalidanti della malattia che derivano dalla frequente ricorrenza di eventi acuti (profilassi a lungo termine)
3. prevenire lo scatenamento di attacchi in condizioni particolari (profilassi a breve termine).

1. Terapia dell'attacco acuto con concentrato plasmatico di C1 inibitore umano

Nel caso di attacchi acuti moderati-severi (addominale, laringeo, cutaneo al volto con coinvolgimento del prolabio e/o della cavità orale) il trattamento prevede la somministrazione del concentrato plasmatico di C1 inibitore umano (500-1000 ev in 10 minuti). Se il concentrato plasmatico di C1 inibitore non è disponibile, nel caso in cui la localizzazione dell'angioedema

sia alla laringe o a rischio di diffondere in tale sede, si somministrano 2 U di plasma fresco congelato [64,65].

2. Terapia profilattica a lungo termine

La terapia continuativa per la prevenzione degli attacchi acuti di angioedema viene riservata ai pazienti con episodi di angioedema frequenti (più di un attacco al mese) e/o quando la severità degli attacchi diventa invalidante (l'inabilità per angioedema supera i 5 giorni al mese).

Per la terapia profilattica a lungo termine si possono utilizzare gli androgeno-derivati danazolo e stanozololo. Questi preparati agiscono verosimilmente incrementando la produzione di C1 inibitore a livello epatico.

Gli androgeno-derivati sono potenzialmente epatotossici. I pazienti vanno quindi monitorati per tale rischio come pure per la possibilità di sviluppare adenoma epatocellulare o carcinoma del fegato anche se le segnalazioni sono solo sporadiche. E' importante un attento monitoraggio durante terapia profilattica a lungo termine con androgeno-derivati con valutazioni cliniche ripetute. Il trattamento con androgeno-derivati è controindicato durante la gravidanza, l'allattamento, durante l'accrescimento e in caso di tumore della prostata.

L'assunzione di androgeno-derivati per lunghi periodi è stata associata con diversi effetti collaterali quali: aumento di peso, amenorrea, diminuzione della libido, irregolarità mestruali, virilizzazione nelle donne (irsutismo, cambiamento della voce, diminuzione di misura del seno), acne, crampi muscolari, mialgia, affaticamento, cefalea, cistiti emorragiche, ipertensione arteriosa, necrosi epatica, colestasi, neoformazioni epatiche.

Per il trattamento profilattico a lungo termine possono essere utilizzati anche farmaci antifibrinolitici (acido tranexamico) benché generalmente risultino meno efficaci degli androgeni nel prevenire gli attacchi. Tale terapia si riserva ai casi nei quali gli androgeni sono

controindicati oppure mal tollerati. L'acido tranexamico è l'antifibrinolitico di scelta in quanto, rispetto all'acido ϵ -aminocaproico, risulta avere minori effetti collaterali [66,67,68].

Nel caso in cui sia necessaria una profilassi a lungo termine nei bambini, si utilizza l'acido tranexamico.

3. Terapia profilattica a breve termine

La profilassi a breve termine è raccomandata in condizioni che possono determinare lo scatenamento di un edema laringeo quali traumatismi sul cavo oro-faringeo (interventi odontoiatrici, endoscopie, interventi chirurgici in anestesia con o senza intubazione).

La profilassi a breve termine può, inoltre, essere presa in considerazione in previsione di eventi importanti in cui il paziente desideri evitare gli attacchi, viaggi e circostanze nelle quali sia difficoltoso l'impiego del concentrato di C1 inibitore.

Per la terapia profilattica a breve termine si possono utilizzare gli androgeno-derivati, gli antifibrinolitici o il C1 inibitore umano.

La terapia dell'angioedema effettuata utilizzando concentrato di C1 inibitore derivato da plasma umano è associata a un rischio di contaminazione da patogeni. Di conseguenza, C1 inibitore umano ricombinante potrebbe rappresentare un'alternativa al derivato plasmatico. La prima forma di C1 inibitore ricombinante è stata ottenuta transfettando cellule COS con un vettore recante il cDNA del C1 inibitore umano e la proteina risultante, anche se prodotta a bassi livelli, si è dimostrata funzionale [69]. Successivamente C1 inibitore umano ricombinante è stato prodotto in quantità più elevate mediante colonie di *Escherichia coli*, ma solo una piccola percentuale della proteina sintetizzata risultava essere attiva [70].

La produzione di C1 inibitore ricombinante è stata quindi effettuata in conigli transgenici ottenuti dalla transfezione di cellule germinali di coniglio con il gene per il C1 inibitore umano

legato a un vettore specifico per la ghiandola mammaria. Il C1 inibitore umano ricombinante è stato quindi purificato dal latte dei conigli mediante tecniche varie, tra cui cromatografia e rimozione dei virus per nanofiltrazione. La proteina ricombinante ottenuta contiene circa il 70% della sequenza aminoacidica originale e la sua attività inibitoria verso le proteasi bersaglio C1s, callicreina e FXII risulta essere paragonabile a quella del C1 inibitore derivato da plasma [70]. Il difetto principale del C1 inibitore umano ricombinante, già testato in alcuni studi clinici in Europa e negli USA, è un'emivita più breve rispetto a quella della proteina derivata da plasma, che lo rende poco adatto per la terapia profilattica [71].

Negli ultimi anni, due composti sono stati approvati per il trattamento degli attacchi acuti: l'icatibant, presente sul mercato europeo e l'ecallantide, il cui utilizzo è stato autorizzato negli USA. L'icatibant è un polipeptide sintetico che agisce come antagonista competitivo della bradichinina per i recettori B2, espressi in maniera costitutiva nelle cellule endoteliali e della muscolatura liscia, ed è formulato per un uso sottocutaneo [72].

L'ecallantide (DX-88) è una proteina ricombinante prodotta dalle cellule del lievito *Pichia pastoris* che lega la callicreina plasmatica e di conseguenza inibisce il rilascio di bradichinina dal chininogeno ad alto peso molecolare. Come l'icatibant, anche l'ecallantide è formulato per essere somministrato per via sottocutanea [73,74]. Entrambi i farmaci si sono dimostrati efficaci nel trattamento degli attacchi, ma la loro emivita non ne consente l'uso nella terapia profilattica.

SCOPO DEL LAVORO

L'angioedema da carenza di C1 inibitore, sia nella forma ereditaria che in quella acquisita, è caratterizzato da attacchi ricorrenti autolimitanti di edema del sottocute, della mucosa dell'apparato gastroenterico e delle alte vie respiratorie. Gli edemi cutanei si localizzano più frequentemente al volto, alle estremità, al tronco e ai genitali provocando una deformazione del distretto colpito. L'interessamento della mucosa gastrointestinale determina una subocclusione intestinale con sintomatologia dolorosa intensa, spesso vomito e, meno frequentemente, diarrea. L'evenienza più grave è l'edema laringeo che, se non prontamente trattato, può portare a morte per soffocamento.

L'angioedema ereditario è dovuto a mutazioni in uno dei due alleli del gene del C1 inibitore, mutazioni che causano una riduzione dei livelli plasmatici della proteina (angioedema di tipo 1) o livelli quantitativamente normali di C1 inibitore con alterata funzionalità (angioedema di tipo 2). Benché la causa della carenza di C1 inibitore sia un difetto genetico, la frequenza e la severità degli episodi di angioedema è estremamente variabile da un paziente all'altro e persino nello stesso paziente in periodi differenti; le motivazioni alla base di tale variabilità non sono note. Le decisioni terapeutiche nei pazienti affetti da angioedema ereditario, come la profilassi a lungo termine per i soggetti con attacchi frequenti, dipendono dalla severità della malattia, ma fino ad ora non esistono marcatori in grado di darne una stima.

La carenza di C1 inibitore comporta un'attivazione del sistema di contatto [75,76,77] e rende instabile la fibrinolisi [78]. Se privato degli enzimi che inducono l'attivazione del sistema di contatto, il plasma carente di C1 inibitore perde la sua capacità di aumentare la permeabilità vascolare [79]. Durante gli attacchi, i pazienti con carenza di C1 inibitore presentano aumentati livelli plasmatici di bradichinina [80]. La bradichinina, generata in seguito al clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare da parte della callicreina plasmatica, media la

vasopermeabilità e determina l'insorgere degli edemi [76,77,80]. Inoltre la generazione di plasmina osservata durante gli attacchi nei pazienti affetti da angioedema ereditario può aumentare il rilascio di bradichinina da parte della callicreina [81].

Scopo del lavoro è l'identificazione di marcatori di severità della malattia analizzando i sistemi coinvolti nella patogenesi dell'angioedema dovuto a carenza di C1 inibitore. In particolare per investigare il sistema del complemento sono stati misurati i livelli plasmatici di C1 inibitore, C1q, C4 e la capacità del C1 inibitore plasmatico di inibire l'attività esterasica di C1s esogena. Come misura indiretta della generazione di bradichinina è stato valutato il clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare. Per poter stabilire se questi dosaggi plasmatici possono essere utili per distinguere le forme lievi da quelle severe (pazienti soggetti a più di 12 attacchi da moderati a severi all'anno o con più di 24 "HAE affected days" all'anno) di angioedema ereditario, i parametri di laboratorio sono stati correlati con la frequenza degli attacchi cui sono andati incontro i pazienti nel corso di un anno.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Il sistema del complemento ed il clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare sono stati analizzati in 123 pazienti affetti da angioedema ereditario (48 uomini, 75 donne, range di età dai 6 ai 77 anni, età media 39.5, SD 16.9, 108 di tipo 1, 15 di tipo 2), in remissione.

Sessanta pazienti erano in profilassi a lungo termine: 53 con dose minima efficace di androgeno-derivati (40 in danazolo e 13 in stanozololo), 5 con acido tranexamico e 2 con concentrato plasmatico di C1 inibitore.

Dieci pazienti sono stati studiati nel corso di 16 differenti attacchi acuti.

Come gruppo di controllo sono stati utilizzati 61 soggetti sani (15 uomini, 46 donne, range di età dai 19 ai 52 anni , età media 21.9 , SD 5.6).

Prelievi

I prelievi di sangue sono stati effettuati utilizzando sodio citrato al 3.2% come anticoagulante. I campioni sono stati centrifugati a 2000 g per 20 minuti a temperatura ambiente, quindi il plasma è stato aliquotato e conservato a -80°C fino all'uso.

Per la valutazione del clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare, è stata utilizzata una miscela di inibitori delle proteasi contenente 100 mM benzamidina, 400 µg/ml polibrene (hexadimethrine bromide), 2 mg/ml inibitore della tripsina di soia, 263 µM leupeptina and 20 mM AEBSF (aminoethylbenzene-sulphonyl fluoride) sciolti in acido/citrato/destrosio (100 mM citrato trisodico, 67 mM acido citrico e 2 % destrosio, pH 4.5). Nove parti di sangue sono state miscelate con una parte di cocktail di inibitori [82], quindi i campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a 2000 g a temperatura ambiente. Il plasma è stato aliquotato e conservato a - 80°C fino all'uso.

Sistema del complemento

C1 inibitore, C1q e C4 antigene sono stati misurati per immunodiffusione radiale (RID) (NOR-Partigen, Siemens Healthcare Diagnostics).

I livelli plasmatici di C1 inibitore funzionale sono stati valutati mediante un saggio cromogenico (Technoclone GmbH, Vienna, Austria) che misura la capacità del C1 inibitore plasmatico di inibire l'attività esterasica di C1s esogena.

Chininogeno ad alto peso molecolare

Il clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare è stato determinato tramite SDS-PAGE e immunoblotting, utilizzando un metodo basato su quello descritto da Berrettini et al. [83].

Dopo il trasferimento elettroforetico delle proteine dal gel a una membrana PVDF (Immobilon; Millipore Corp, Milford, MA), l'HK è stato identificato mediante un anticorpo policlonale anti-light chain ottenuto in capra (Nordic, Tilburg, the Netherlands) e visualizzato tramite un anticorpo biotinilato anti-capra sviluppato in coniglio (Sigma Chemical Co, St Louis, MO).

Le masse molecolari apparenti delle proteine sono state stimate per confronto con un marker per proteine ad alto peso molecolare (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Con questo metodo, il chininogeno ad alto peso molecolare nativo appare come una banda di M_r 130.000 e il chininogeno clivato come due bande di M_r 107.000 e 98.000. La densità delle bande è stata misurata utilizzando un densitometro Bio-Rad GS800. La quantità di HK clivato (bande con M_r 107.000 and 98.000) è stata espressa come percentuale dell'HK totale (somma delle tre bande) [84].

Statistica

I risultati sono riportati come media \pm deviazione standard (SD). La significatività delle differenze tra gruppi è stata valutata mediante il test non-parametrico di Mann-Whitney. I dati

sono stati analizzati utilizzando il programma statistico SPSS, versione 15.00 (SPSS INC., Chicago, IL, USA).

RISULTATI

Le caratteristiche dei pazienti oggetto dello studio sono riportate nelle tabelle 1 e 2.

I soggetti con angioedema ereditario in remissione presentano una significativa riduzione rispetto ai controlli sani, di C1-INH funzionale e di C4 antigene (Tab.3), come atteso. Anche i livelli antigenici di C1-INH sono significativamente ridotti, ma con un'ampia dispersione dal momento che alcuni pazienti (n = 15) sono caratterizzati da angioedema ereditario di tipo 2, variante fenotipica della patologia in cui l'allele mutato di C1-INH esprime un prodotto proteico misurabile antigenicamente, ma non funzionante.

Nel corso di episodi di angioedema i livelli plasmatici di C1-INH funzionale e di C1q antigene si modificano significativamente rispetto alla condizione basale (Tab.3).

Quale misura indiretta della generazione di bradichinina è stato valutato il clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare. Come già detto, il clivaggio dell'HK è stato determinato tramite SDS-PAGE e immunoblotting, utilizzando un metodo basato su quello descritto da Berrettini et al. [83]. Analizzando plasma di soggetti sani si osserva una banda principale di M_r 130.000, corrispondente all'HK nativo e una banda meno intensa con M_r 107.000, che rappresenta un prodotto catabolico (Fig.6). Dopo attivazione in vitro del sistema di contatto con caolino, il plasma normale è caratterizzato esclusivamente dalla banda con M_r 107.000 e da una banda con M_r 98.000. Nei pazienti affetti da angioedema ereditario in remissione, l'analisi del clivaggio dell'HK evidenzia un pattern variabile correlato con la gravità della malattia, definita in base al numero di attacchi verificatisi nel corso di un anno. Il plasma prelevato da pazienti durante un attacco di angioedema mostra una evidente riduzione dell'intensità della banda con M_r 130.000 ed un aumento della densità delle bande corrispondenti all'HK clivato (Fig.6).

I livelli plasmatici di chininogeno ad alto peso molecolare clivato risultano significativamente più alti nei pazienti affetti da angioedema ereditario in remissione ($43,9\% \pm 8,5$) rispetto ai soggetti normali ($35,2\% \pm 5,3$) ($P = 0,0001$) ed incrementano ulteriormente durante gli attacchi ($58,5\% \pm 7,5$) ($P = 0,0001$), come si può osservare in Tab.3 ed in Fig.7.

Dei 123 pazienti affetti da angioedema ereditario testati, 63 non effettuavano terapia profilattica a lungo termine. I valori dell'HK clivato e dei parametri del complemento sono stati analizzati dividendo i pazienti in tre gruppi in base al numero di attacchi di angioedema cui sono andati incontro nel corso di un anno. Il clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare risulta significativamente aumentato nei pazienti in assenza di terapia caratterizzati da più di 12 attacchi all'anno ($50,4\% \pm 5,9$) rispetto a quelli con meno di tre attacchi all'anno ($36,0\% \pm 6,6$) ($P = 0,0001$) ed anche rispetto ai soggetti con un numero intermedio di attacchi (3-12 attacchi all'anno) ($45,9\% \pm 7,0$) ($P = 0,04$) (Fig.8 e Tab.4). Il valore medio dell'HK clivato nei soggetti con forma lieve della patologia (pazienti che hanno presentato meno di 3 attacchi in un anno) non differisce significativamente da quello misurato nei soggetti sani (Fig.8).

I parametri del complemento misurati non presentano differenze significative tra i gruppi di pazienti suddivisi in base alla frequenza degli attacchi, ad eccezione del dosaggio antigenico del C4 che mostra una significativa riduzione tra pazienti con forma lieve e severa della malattia ($P = 0,036$) (Tab.4 e Fig.9).

La relazione tra severità della malattia e parametri del complemento o della fase di contatto è stata analizzata anche nei 60 pazienti che effettuavano terapia profilattica durante il periodo di studio. I livelli plasmatici di C1-INH funzionale e di C4 antigene sono significativamente più alti nei pazienti in terapia con danazolo rispetto ai pazienti che non effettuano profilassi, come si può osservare in Tab.5. I livelli di chininogeno ad alto peso molecolare clivato non

differiscono in maniera significativa tra pazienti in terapia con androgeno-derivati e pazienti che non assumono questo tipo di farmaci (Fig.10).

Tra i pazienti in terapia con androgeno-derivati i livelli di HK clivato sono significativamente più elevati nei soggetti che presentano un'alta frequenza di attacchi rispetto a pazienti con un numero intermedio o basso di episodi di angioedema (Tab.6 e 7 e Fig.11). I valori dei parametri del complemento nei pazienti trattati con androgeno-derivati sono riportati in Tab. 6 e 7.

L'effetto della terapia con androgeno-derivati sui livelli plasmatici di HK clivato è stata analizzata in tre pazienti testati prima e dopo l'inizio della profilassi a lungo termine. Come si può osservare nella Fig.12, la terapia profilattica determina una riduzione della percentuale di chininogeno ad alto peso molecolare clivato.

| | |
|----------------------------|-------------------------------|
| Numero dei pazienti | 123 |
| Età media (range) | 39,5 ± 16,9 (6-77) |
| Maschi/Femmine | 48 (39,5%)/75 (60,5%) |
| AEE tipo1/2 | 108 (87,9%)/15 (12,1%) |

Tab.1 Dati descrittivi dei pazienti.

| Profilassi | Range di dosaggio | Numero di pazienti | <3 attacchi/anno | 3-12 attacchi/anno | >12 attacchi/anno |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| No profilassi | | 63 | 23 | 18 | 22 |
| Danazolo | 50-200 mg/die | 40 | 22 | 9 | 9 |
| Stanozololo | 2-4 mg/die | 13 | 1 | 7 | 5 |
| Acido tranexamico | 1,5-3 g/die | 5 | 1 | 2 | 2 |
| C1-INH | 1000 U.I. 3 volte/settimana | 2 | | | 2 |

Tab.2 Frequenza di attacchi nei pazienti affetti da angioedema ereditario in assenza ed in presenza di profilassi.

| Gruppo | HK clivato % | C1-INH Fx% | C1-INH Ag% | C4 Ag % | C1q Ag % |
|--|---------------------|-------------------|-------------------|----------------|--------------------------|
| Controlli (n = 61) | 35,2 ± 5,3 | 82,2 ± 14,2 | 99,9 ± 10,4 | 98,1 ± 22,6 | 99,6 ± 3,1 |
| AEE in remissione (n = 123) | 43,9 ± 8,5** | 17,5 ± 9,9** | 29,9 ± 33,7** | 28,6 ± 22,7** | 97,5 ± 14,3* |
| AEE in attacco (n = 16) | 58,5 ± 7,5° | 11,8 ± 4,4° | 15,9 ± 8,1^ | 18,1 ± 12,0^^ | 88,5 ± 24,1 ⁺ |

Tab.3 Valori (%) dell'HK clivato e dei parametri del complemento nei controlli (n = 61), nei pazienti AEE in remissione (n = 123) e nei pazienti AEE in attacco (n = 16).

**P = 0,0001 *P = 0,53 differenze di significatività calcolate tra controlli e pazienti AEE in remissione

°P = 0,0001 °°P = 0,005 ^P = 0,23 ^^P = 0,12 +P = 0,003 differenze di significatività calcolate tra pazienti AEE in remissione e nel corso di un attacco.

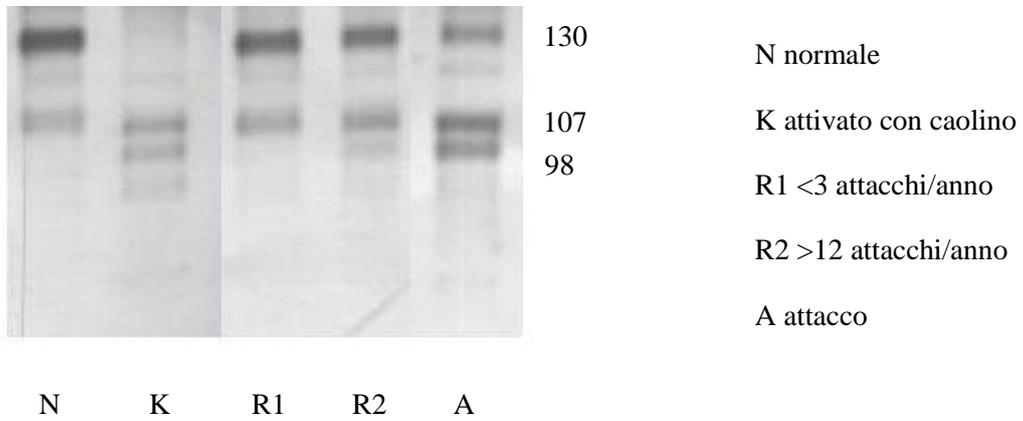


Fig.6 Western blot per la valutazione del clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare nel plasma di soggetti normali e di pazienti affetti da AEE. La corsia N contiene plasma di un soggetto sano, la corsia K plasma di un soggetto normale attivato in vitro con caolino. Le corsie R1 e R2 rappresentano pazienti affetti da AEE con diversa gravità della patologia e la corsia A contiene plasma di un paziente prelevato nel corso di un attacco.

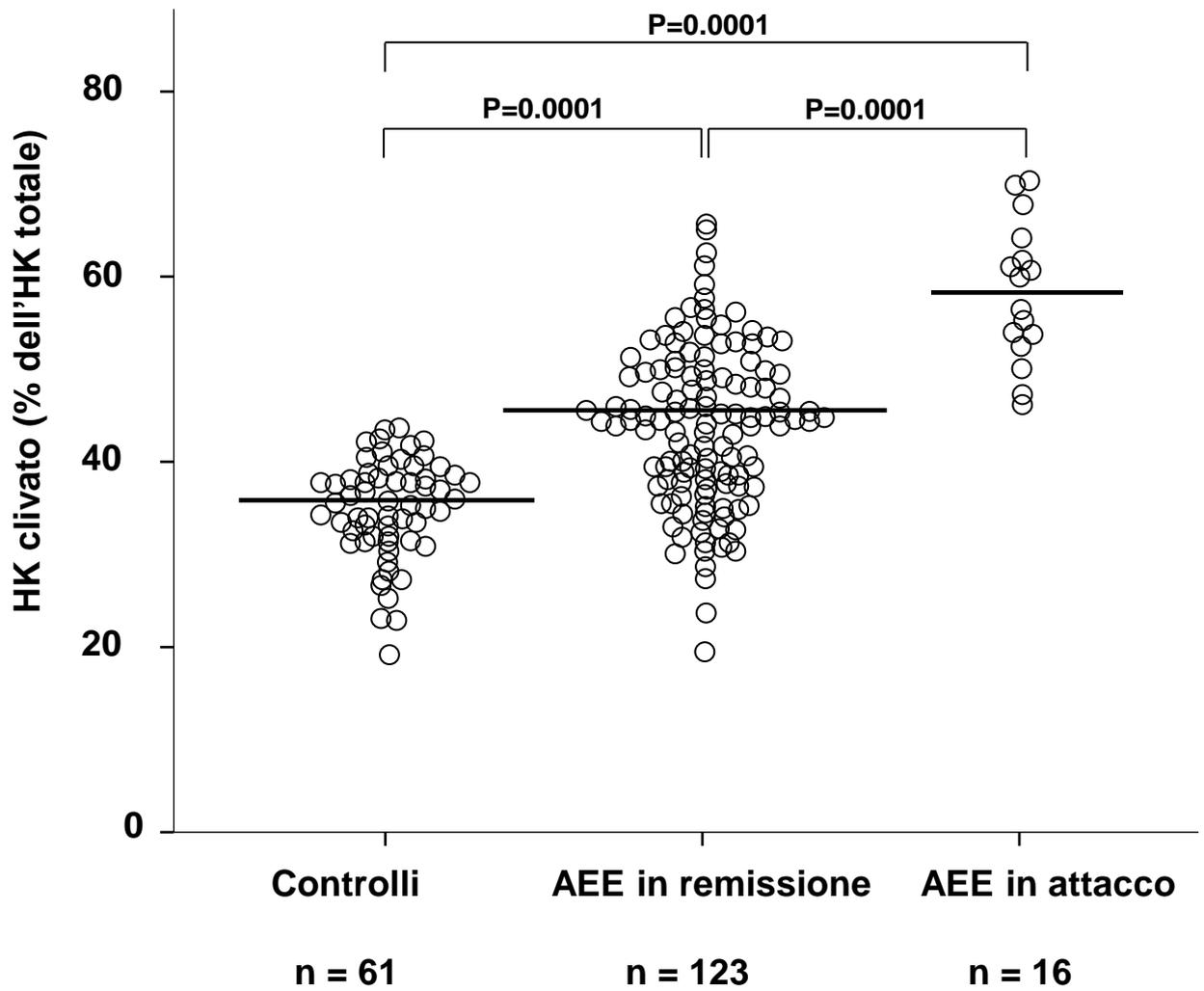


Fig.7 Livelli plasmatici di HK clivato (%) nei soggetti sani (n = 61), nei pazienti affetti da angioedema ereditario in remissione (n = 123) e durante gli attacchi (n = 16). Le linee orizzontali rappresentano le mediane.

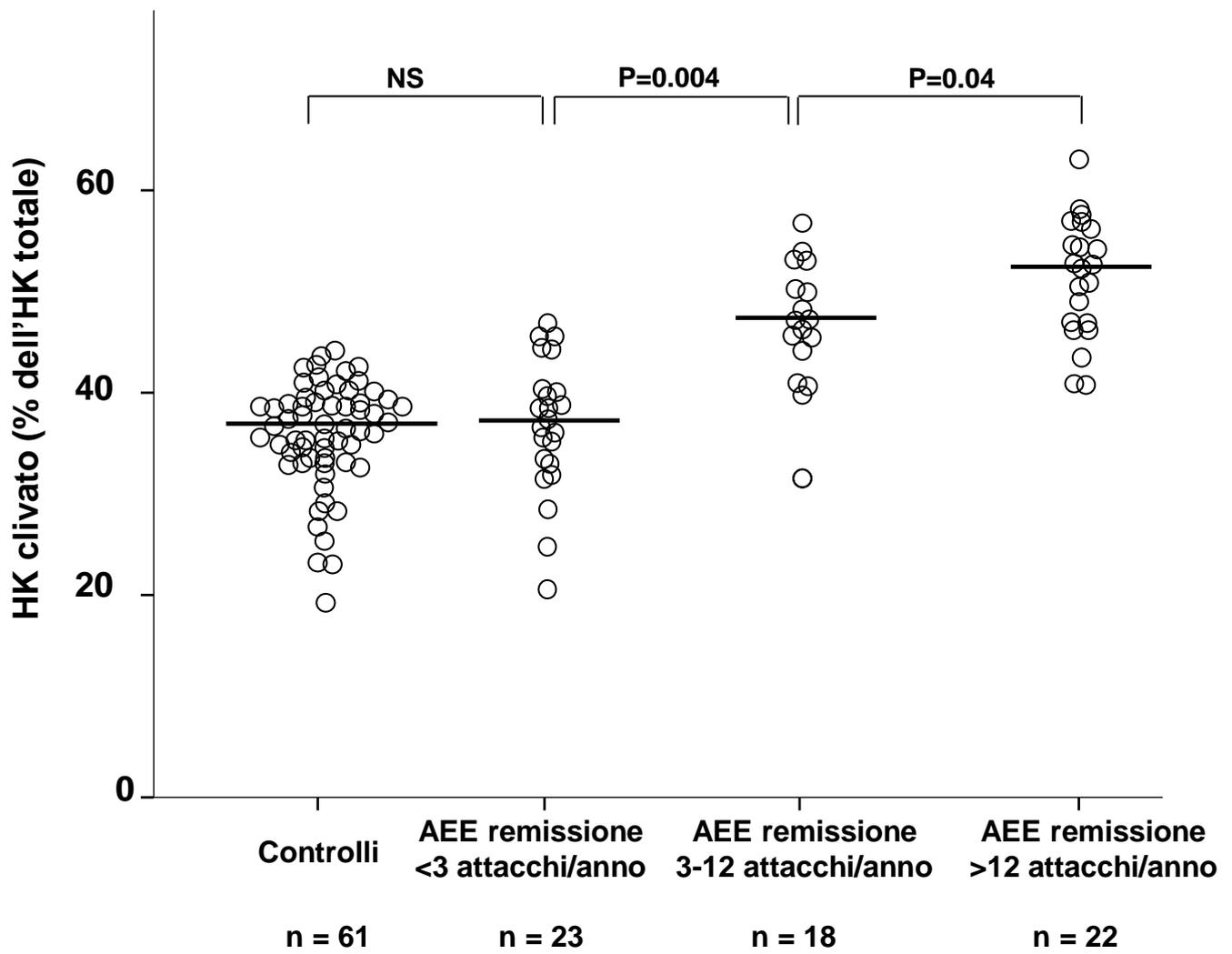


Fig.8 Livelli plasmatici di HK clivato (%) nei soggetti sani (n = 61), nei pazienti affetti da angioedema ereditario in assenza di terapia con meno di 3 attacchi/anno (n = 23), nei pazienti con 3-12 attacchi/anno (n = 18) e nei pazienti con più di 12 attacchi/anno (n = 22). Le linee orizzontali rappresentano le mediane.

| Frequenza di attacchi | HK clivato % | C1-INH Fx% | C1-INH Ag% | C4 Ag % | C1q Ag % |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|----------------|-----------------|
| Controlli (n = 61) | 35,2 ± 5,3 | 82,2 ± 14,2 | 99,9 ± 10,4 | 98,1 ± 22,6 | 99,6 ± 3,1 |
| < 3 attacchi/anno (n = 23) | 36,0 ± 6,6 | 17,7 ± 9,7 | 19,3 ± 16,1 | 28,2 ± 22,0 | 98,2 ± 10,6 |
| 3-12 attacchi/anno (n = 18) | 45,9 ± 7,0* | 14,7 ± 7,3 | 28,0 ± 22,8 | 20,0 ± 10,7 | 94,7 ± 22,4 |
| >12 attacchi/anno (n = 22) | 50,4 ± 5,9** | 15,0 ± 7,4 | 22,2 ± 19,2 | 16,4 ± 11,2^ | 91,7 ± 26,6 |

Tab.4 Valori (%) dell'HK clivato e dei parametri del complemento nei controlli (n = 61), nei pazienti affetti da angioedema ereditario in remissione che non effettuano profilassi con meno di 3 attacchi/anno (n = 23), nei pazienti con 3-12 attacchi/anno (n = 18) e nei pazienti con più di 12 attacchi/anno (n = 22).

*P = 0,004 rispetto a pazienti con meno di 3 attacchi/anno

**P = 0,04 rispetto a pazienti con 3-12 attacchi/anno

^P = 0,036 rispetto a pazienti con meno di 3 attacchi/anno

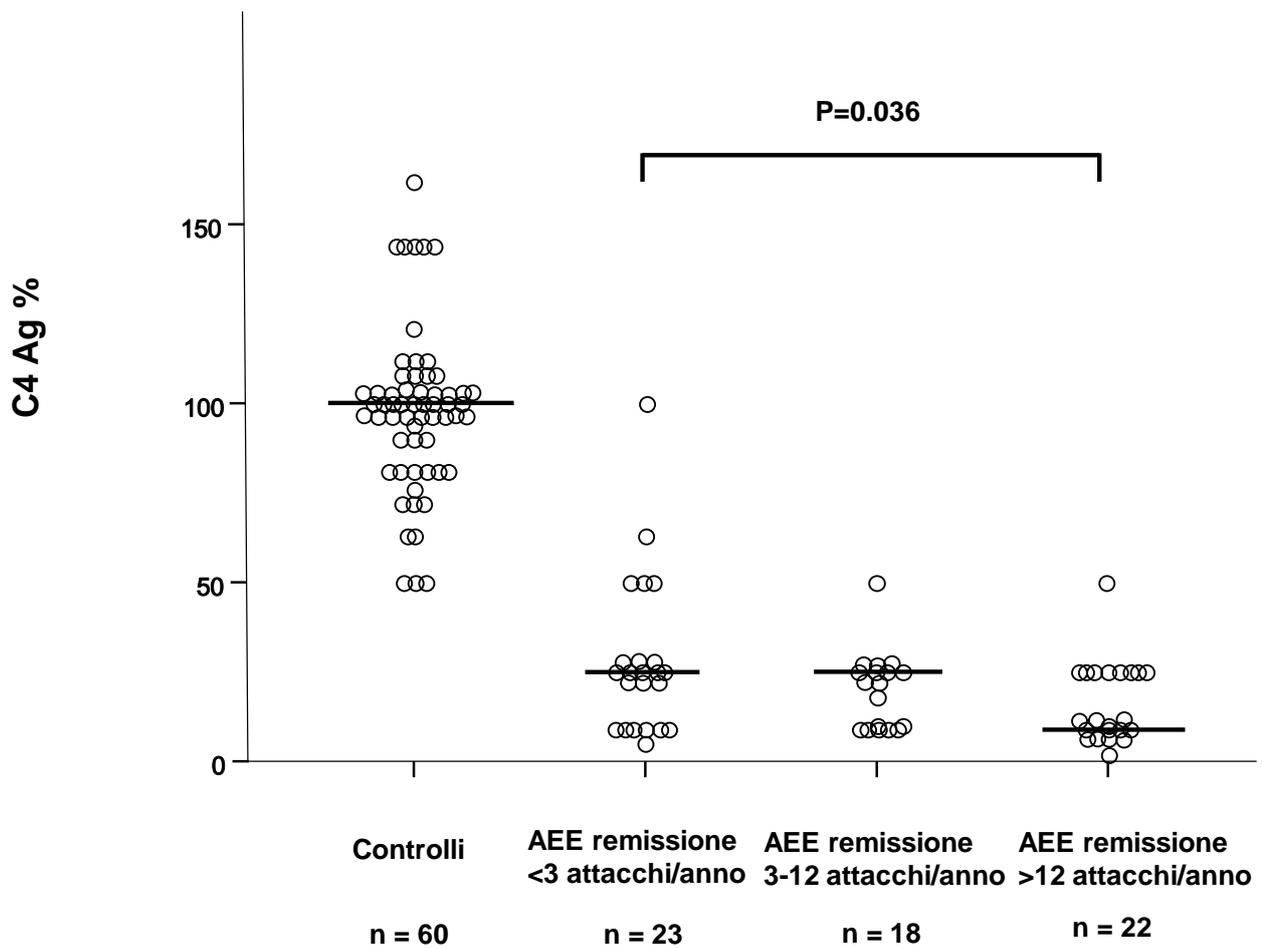


Fig.9 Livelli plasmatici di C4 Ag (%) nei soggetti sani (n = 61), nei pazienti affetti da angioedema ereditario in assenza di terapia con meno di 3 attacchi/anno (n = 23), nei pazienti con 3-12 attacchi/anno (n = 18) e nei pazienti con più di 12 attacchi/anno (n = 22). Le linee orizzontali rappresentano le mediane.

| Gruppo | HK clivato % | C1-INH Fx% | C1-INH Ag% | C4 Ag % | C1q Ag % |
|---|---------------------|-------------------|-------------------|----------------|-----------------|
| Controlli (n = 61) | 35,2 ± 5,3 | 82,2 ± 14,2 | 99,9 ± 10,4 | 98,1 ± 22,6 | 99,6 ± 3,1 |
| AEE no terapia (n = 63) | 44,3 ± 9,1 | 15,7 ± 8,2 | 22,6 ± 19,1 | 21,5 ± 16,3 | 97,3 ± 15,1 |
| AEE in danazolo (n = 40) | 42,7 ± 7,4 | 22,4 ± 12,1* | 39,5 ± 41,8 | 41,8 ± 28,1** | 99,4 ± 3,9 |
| AEE in stanazololo (n = 13) | 44,8 ± 8,9 | 13,3 ± 6,4 | 19,1 ± 8,3 | 27,1 ± 18,7 | 99,8 ± 2,5 |
| AEE in ac. Tranexamico (n = 5) | 51,6 ± 10,0 | 10,4 ± 0,9 | 18,6 ± 8,8 | 15,4 ± 8,8 | 99,9 ± 3,1 |

Tab.5 Valori (%) dell'HK clivato e dei parametri del complemento nei controlli, nei pazienti AEE in assenza di terapia e nei pazienti AEE che effettuano profilassi.

*P = 0,007 rispetto a pazienti che non effettuano terapia

**P = 0,0001 rispetto a pazienti che non effettuano terapia

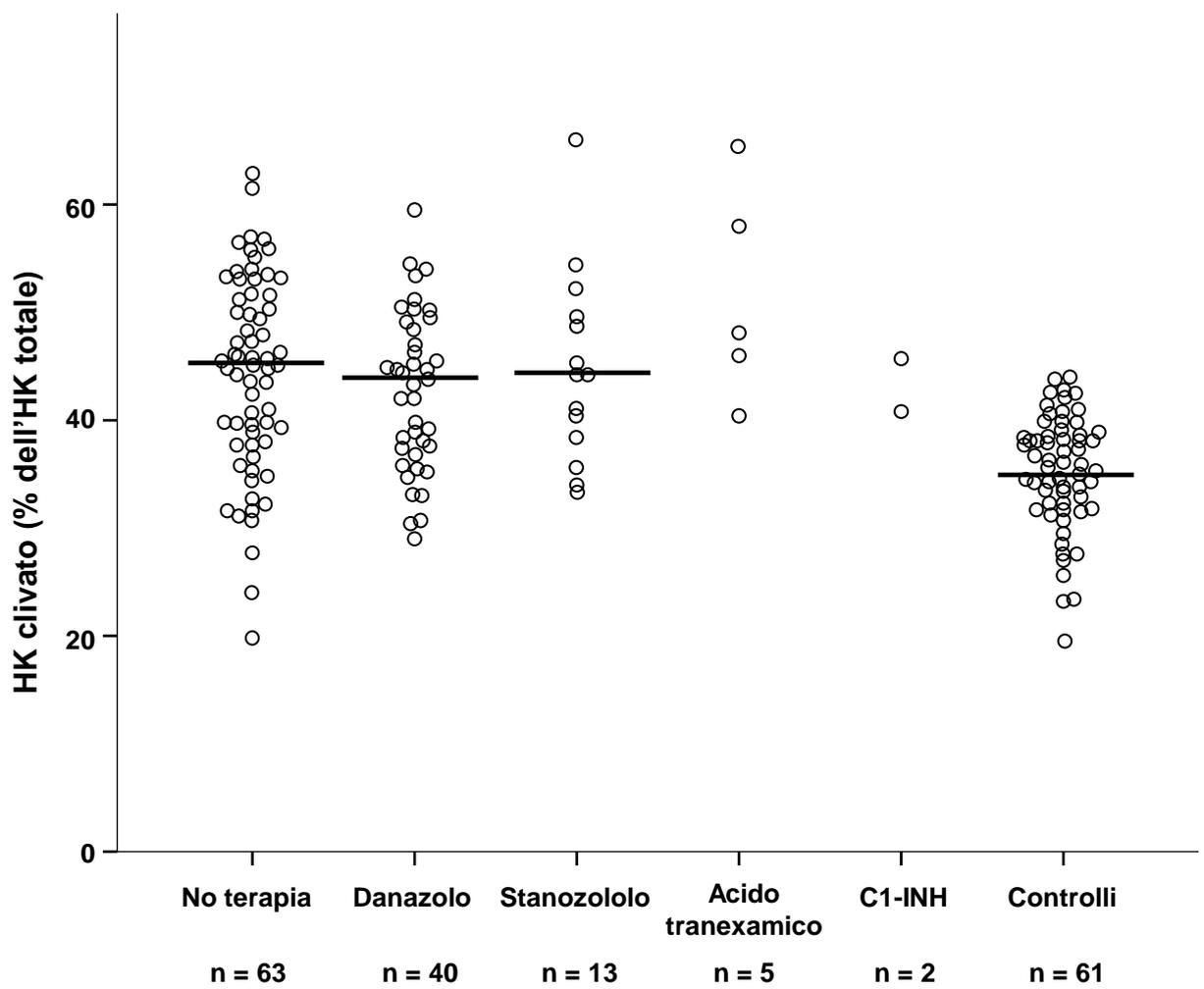


Fig.10 Livelli plasmatici di HK clivato (%) nei pazienti affetti da angioedema ereditario in assenza di terapia e durante terapia profilattica. Le linee orizzontali rappresentano le mediane.

| Frequenza di attacchi | HK clivato % | C1-INH Fx% | C1-INH Ag% | C4 Ag % | C1q Ag % |
|---|---------------------|-------------------|-------------------|----------------|-----------------|
| Controlli (n = 61) | 35,2 ± 5,3 | 82,2 ± 14,2 | 99,9 ± 10,4 | 98,1 ± 22,6 | 99,6 ± 3,1 |
| < 3 attacchi/anno (n = 22) danazolo | 40,6 ± 6,3 | 22,9 ± 11,5 | 48,0 ± 51,2 | 44,5 ± 30,8 | 99,8 ± 3,2 |
| 3-12 attacchi/anno (n = 9) danazolo | 40,2 ± 7,0 | 22,7 ± 11,7 | 39,9 ± 26,8 | 46,2 ± 28,1 | 99,5 ± 3,7 |
| >12 attacchi/anno (n = 9) danazolo | 50,3 ± 5,6* | 20,8 ± 15,1 | 18,4 ± 14,4 | 30,8 ± 19,5 | 97,0 ± 8,8 |

Tab.6 Valori (%) dell'HK clivato e dei parametri del complemento nei controlli (n = 61), nei pazienti affetti da angioedema ereditario in profilassi con danazolo con meno di 3 attacchi/anno (n = 22), nei pazienti con 3-12 attacchi/anno (n = 9) e nei pazienti con più di 12 attacchi/anno (n = 9).

*P = 0,001 rispetto a pazienti con <3 attacchi/anno

| Frequenza di attacchi | HK clivato % | C1-INH Fx% | C1-INH Ag% | C4 Ag % | C1q Ag % |
|---|---------------------|-------------------|-------------------|----------------|-----------------|
| Controlli (n = 61) | 35,2 ± 5,3 | 82,2 ± 14,2 | 99,9 ± 10,4 | 98,1 ± 22,6 | 99,6 ± 3,1 |
| < 3 attacchi/anno (n = 1) stanozololo | 44,2 | 28,0 | 25,0 | 25,0 | 100 |
| 3-12 attacchi/anno (n = 7) stanozololo | 41,9 ± 7,6 | 11,1 ± 2,0 | 18,1 ± 8,5 | 27,1 ± 21,1 | 99,8 ± 3,5 |
| >12 attacchi/anno (n = 5) stanozololo | 47,1 ± 11,4 | 10,4 ± 0,9 | 18,0 ± 9,7 | 22,8 ± 17,7 | 99,5 ± 3,6 |

Tab.7 Valori (%) dell'HK clivato e dei parametri del complemento nei controlli (n = 61), nei pazienti affetti da angioedema ereditario in profilassi con stanozololo con meno di 3 attacchi/anno (n = 1), nei pazienti con 3-12 attacchi/anno (n = 7) e nei pazienti con più di 12 attacchi/anno (n = 5).

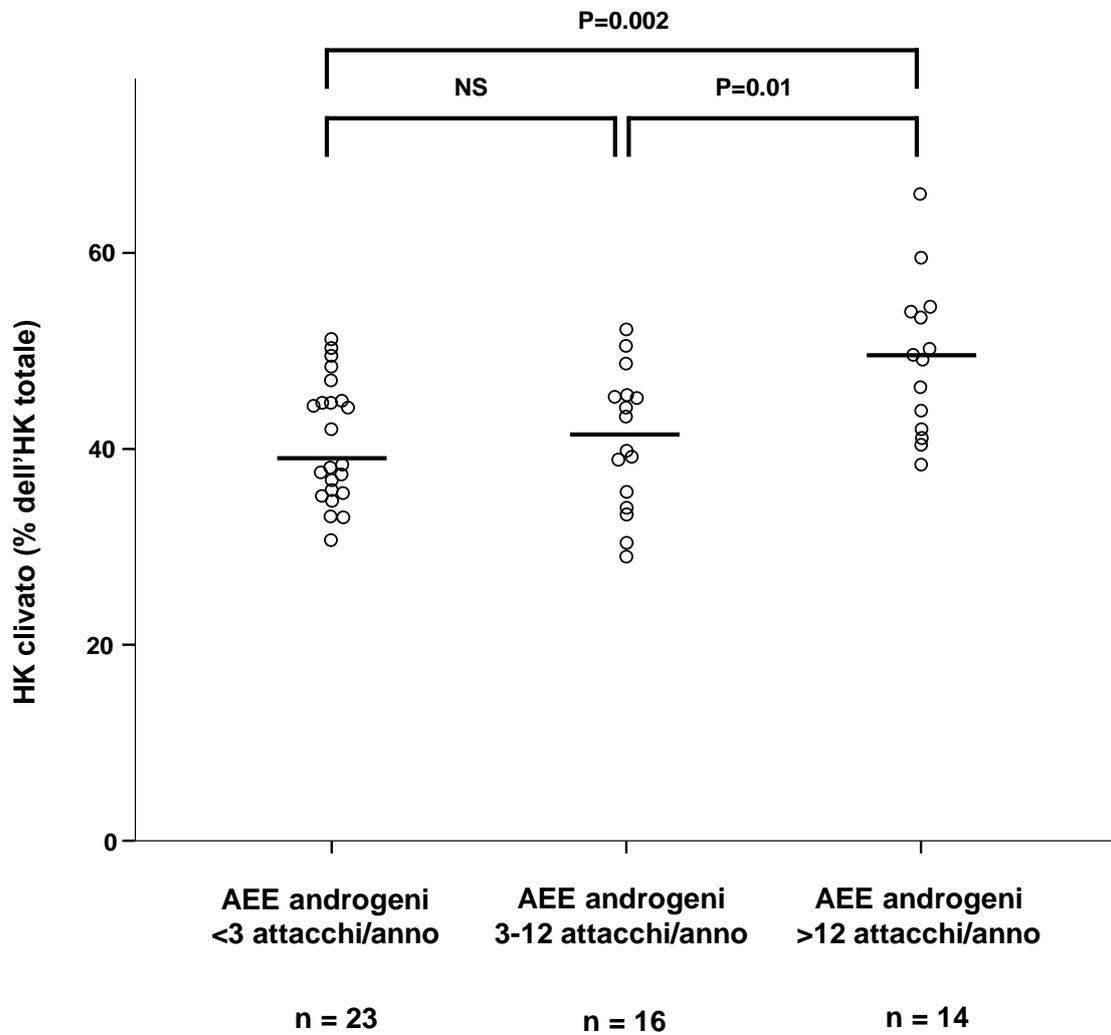


Fig.11 Livelli plasmatici di HK clivato (%) nei pazienti affetti da angioedema ereditario in profilassi con androgeno-derivati con meno di 3 attacchi/anno (n = 23), nei pazienti con 3-12 attacchi/anno (n = 16) e nei pazienti con più di 12 attacchi/anno (n = 14).

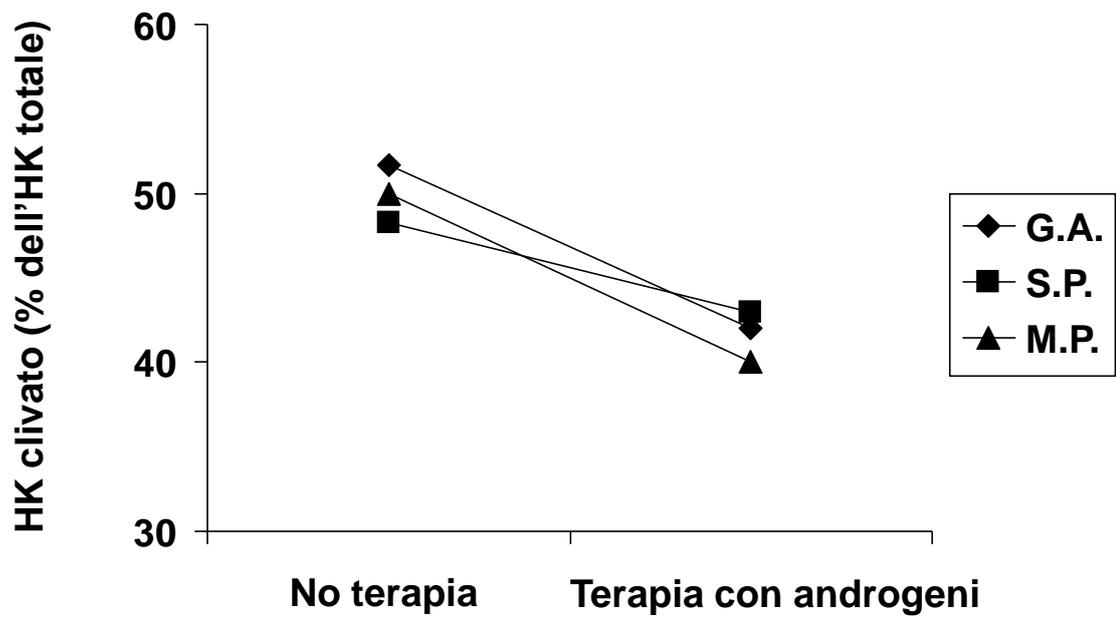


Fig.12 Livelli plasmatici di HK clivato (%) in tre pazienti misurati prima e dopo l'inizio della profilassi con androgeno-derivati

DISCUSSIONE

Il deficit di C1 inibitore ha conseguenze fisiopatologiche ben note: sistema del complemento, sistema di contatto, fibrinolisi e coagulazione divengono instabili ed in presenza di un fattore scatenante (trauma o stress psichico, per quanto noto fino ad ora) portano alla liberazione locale di elevate quantità di bradichinina, che determina la manifestazione clinica nota come angioedema. Pur essendo stati identificati gli eventi che portano alla formazione dell'edema, ad oggi non è possibile individuare i soggetti con una maggiore propensione allo sviluppo di attacchi. La frequenza e la gravità dei sintomi nell'angioedema ereditario sono estremamente variabili da un paziente all'altro e persino nello stesso paziente in periodi differenti. Il 30% dei soggetti affetti da angioedema ereditario manifesta più di un attacco al mese; d'altra parte il 7% dei pazienti rimane asintomatico. Le decisioni terapeutiche nei pazienti AEE, come la profilassi a lungo termine per i soggetti con attacchi frequenti, dipendono dalla severità della malattia, ma fino ad ora non esistono marcatori in grado di darne una stima. Sarebbe di grande valore l'individuazione di un parametro di laboratorio in grado di supportare il dato clinico per selezionare i soggetti predisposti a sviluppare angioedema.

Al fine di identificare marcatori di severità della malattia è stato analizzato il sistema del complemento, mediante il dosaggio dei livelli plasmatici di C1 inibitore funzionale e antigenico, C1q antigene, e C4 antigene. Come misura indiretta della generazione di bradichinina è stato valutato il clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare, dal momento che la bradichinina viene rilasciata in seguito al taglio dell'HK da parte della callicreina.

La popolazione di pazienti, sottoposti o meno a terapia, è stata suddivisa in tre gruppi in base al numero di attacchi verificatisi nel corso di un anno: pazienti che hanno manifestato meno di tre attacchi, tra 3 e 12 attacchi oppure più di 12 attacchi nel corso di un anno. In assenza di terapia profilattica i parametri del complemento misurati non presentano differenze significative tra i

gruppi di pazienti suddivisi in base alla frequenza degli attacchi, ad eccezione del dosaggio antigenico del C4 che mostra una significativa riduzione tra pazienti con forma lieve e severa della malattia. In un recente studio di Csuka e colleghi [85] è stata dimostrata l'esistenza di una correlazione positiva tra livelli plasmatici di complessi C1rC1sC1-INH e la frequenza degli attacchi, ed è stata messa in risalto una correlazione negativa tra dosaggi di C1-INH funzionale e di C4 antigene e la severità della malattia. C4, substrato di C1r e C1s, le due proteasi complementari che riconoscono in C1-INH il loro unico inibitore [16], è tipicamente consumato in condizioni di carenza di C1-INH e viene utilizzato a supporto della diagnosi di deficit di C1-INH laddove il dosaggio funzionale di C1-INH non sia fattibile. I dati ottenuti nel presente studio confermano la sensibilità di C4 nel seguire le modificazioni dei diversi stati di malattia dei soggetti con AEE. C4 è infatti ridotto significativamente nei pazienti con alta frequenza di attacchi rispetto a soggetti con forma lieve della patologia. Se si valutano i dosaggi antigenici di C4 nei pazienti trattati con androgeno attenuati si osserva che le differenze tra pazienti con diversa frequenza di attacchi non raggiungono la significatività. I livelli plasmatici di C4 sono determinati da due geni diversi, C4A e C4B, che possono essere presenti ciascuno in una, due, tre (raramente quattro) copie nel genoma di differenti individui [86]. E' noto che l'assetto polimorfico di C4 ne condiziona i livelli plasmatici e risente direttamente del trattamento con androgeno derivato. E' quindi verosimile che le variazioni di C4 registrate in corso di terapia non siano solo ed esclusivamente funzione della normalizzazione dell'attivazione della via classica complementare secondaria all'effetto su C1-INH, ma siano, almeno in parte, conseguenza di una variabilità individuale di risposta, dei due geni codificanti, allo stimolo ormonale [87,88]. Sulla base di questi dati riteniamo di poter concludere che C4 è un buon marcatore dello stato di malattia dei soggetti con AEE, ma il suo valore è limitato nei pazienti in terapia con androgeni.

Per l'analisi del clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare, i prelievi sono stati effettuati utilizzando una miscela di inibitori delle proteasi [82] in modo da evitare l'attivazione della fase di contatto durante la manipolazione del campione. Come dimostrato da Joseph e colleghi [89], infatti, l'attivazione dell'HK può essere osservata in campioni di plasma di pazienti affetti da angioedema ereditario incubati in una provetta senza che venga aggiunto alcun attivatore. Abbiamo effettuato un'analisi preliminare, non mostrata in questo lavoro, misurando la percentuale di HK clivato in campioni di plasma raccolti utilizzando sodio citrato come anticoagulante ed abbiamo trovato valori molto alti nei pazienti affetti da AEE in remissione (72%, n = 10).

Considerando la totalità dei pazienti testati, indipendentemente dalla terapia effettuata, i livelli plasmatici di chininogeno ad alto peso molecolare clivato risultano significativamente più alti nei pazienti in remissione rispetto ai soggetti normali ed incrementano ulteriormente durante gli attacchi. Se si considerano i soggetti che non effettuano terapia profilattica, il clivaggio dell'HK risulta significativamente aumentato nei pazienti caratterizzati da più di 12 attacchi all'anno rispetto a quelli con meno di tre attacchi all'anno ed anche rispetto ai soggetti con un numero intermedio di attacchi. Il valore medio dell'HK clivato nei soggetti con forma lieve della patologia (pazienti che hanno presentato meno di 3 attacchi in un anno) non differisce significativamente da quello misurato nei soggetti sani. Ciò è in accordo con quanto osservato in uno studio precedente di Cugno e colleghi [84], effettuato su un numero inferiore di pazienti. Nei pazienti in terapia con androgeno-derivati i livelli di HK clivato sono significativamente più elevati nei soggetti che presentano un'alta frequenza di attacchi rispetto a pazienti con un numero intermedio o basso di episodi di angioedema. Sulla base di questi dati riteniamo di poter concludere che il chininogeno ad alto peso molecolare è un buon marcatore dello stato di malattia dei soggetti affetti da angioedema ereditario, anche nei pazienti che effettuano terapia con androgeni.

I risultati ottenuti mostrano che la determinazione del clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare rappresenta il miglior parametro individuato fino ad ora per definire i diversi stati della malattia in pazienti affetti da angioedema ereditario. Insieme ad altri marcatori da noi recentemente individuati [90], può diventare uno strumento utile nel monitoraggio dei pazienti, benché si renda necessaria una metodica più semplice rispetto a SDS-PAGE e western blot per trasferire il dosaggio dell'HK clivato nella pratica clinica.

RIASSUNTO

L'angioedema ereditario è una malattia genetica con una prevalenza stimata tra 1/10000 e 1/50000, trasmessa con modalità autosomica dominante e in cui il difetto genico risulta in una ridotta sintesi o alterata funzionalità del C1 inibitore. La carenza di C1-INH causa edemi mucocutanei ricorrenti. A seconda del sito interessato, i pazienti vanno incontro a edema sottocutaneo deformante, dolore addominale, vomito e/o diarrea, disfagia e disfonia fino ad asfissia nel caso di edema della laringe o della faringe. La frequenza e la severità dei sintomi sono altamente variabili tra i pazienti e persino relativamente allo stesso paziente nel corso del tempo. Le decisioni terapeutiche nei pazienti AEE, come la profilassi a lungo termine per i soggetti con attacchi frequenti, dipendono dalla severità della malattia, ma fino ad ora non esistono marcatori in grado di darne una stima.

Sono stati descritte alcune varianti fenotipiche della patologia: l'angioedema ereditario di tipo 1, che comprende circa l'80-85% dei casi, è definito da concentrazioni plasmatiche ridotte di C1 inibitore (con livelli tra il 5 e il 30% dei valori normali). Le mutazioni che causano l'angioedema ereditario di tipo 1 sono distribuite lungo tutto il gene del C1 inibitore. In contrasto, nell'angioedema di tipo 2 (15-20% dei casi) le mutazioni sono tipicamente singole sostituzioni aminoacidiche localizzate in corrispondenza del sito attivo del C1-INH o vicino ad esso. L'angioedema ereditario di tipo 2 è caratterizzato da livelli plasmatici di C1 inibitore normali, o persino aumentati, ma la proteina secreta risulta essere disfunzionale. Sia il tipo 1 che il tipo 2 sono associati a ridotti livelli antigenici di C4 mentre i dosaggi di C3 e di C1q sono generalmente nella norma.

Presso il nostro centro sono seguiti 485 pazienti appartenenti a 183 famiglie. La maggior parte di questi pazienti esegue presso il nostro centro controlli periodici per valutare l'andamento della malattia, l'efficacia della terapia e la comparsa di eventuali altre patologie. La diagnosi si

basa sulla storia familiare e personale (manifestazioni cliniche) e su determinazioni biochimiche dei livelli plasmatici antigenici e funzionali di C1-INH, di C4 e di C1q.

Il C1-INH ha un ampio spettro di attività, dal momento che inibisce il sistema del complemento, la fase di contatto, la coagulazione e la fibrinolisi. Nel caso di deficit di C1-INH questi sistemi risultano instabili nei pazienti durante la fase di remissione. Nel corso degli attacchi, i pazienti con carenza di C1 inibitore presentano aumentati livelli plasmatici di bradichinina. La bradichinina, generata in seguito al clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare da parte della callicreina plasmatica, media la vasopermeabilità e determina l'insorgere degli edemi.

Scopo del lavoro è l'identificazione di marcatori di severità della malattia analizzando i sistemi coinvolti nella patogenesi dell'angioedema dovuto a carenza di C1 inibitore. In particolare per studiare il sistema del complemento sono stati dosati i i livelli plasmatici di C1 inibitore funzionale e sono stati misurati i livelli antigenici di C1q, C4 e C1-INH. Come misura indiretta della generazione di bradichinina è stato valutato il clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare, mediante SDS-PAGE, western blot e successiva analisi densitometrica delle bande ottenute.

Il sistema del complemento ed il clivaggio dell'HK sono stati analizzati in 123 pazienti affetti da angioedema ereditario in remissione. I pazienti sono stati suddivisi in tre sottogruppi in base al numero degli attacchi verificatisi nel corso di un anno. Tra i pazienti in assenza di profilassi, 23 hanno presentato meno di tre attacchi di angioedema nel corso degli ultimi dodici mesi, 18 sono andati incontro ad un numero di attacchi compreso tra 3 e 12 e 22 pazienti hanno manifestato più di 12 attacchi nel corso dell'ultimo anno. Dei 60 pazienti in profilassi, 40 assumevano danazolo, 13 stanozololo, 5 acido tranexamico e 2 C1-INH. Dieci pazienti sono stati studiati nel corso di 16 differenti attacchi acuti. Come gruppo di controllo sono stati utilizzati 61 soggetti sani.

I soggetti con angioedema ereditario in remissione presentano una significativa riduzione rispetto ai controlli sani, di C1-INH funzionale e di C4 antigene, come atteso. Nel corso di episodi di angioedema i livelli plasmatici di C1-INH funzionale e di C1q antigene si modificano significativamente rispetto alla condizione basale. I parametri del complemento misurati non presentano differenze rilevanti tra i gruppi di pazienti suddivisi in base alla frequenza degli attacchi, ad eccezione del dosaggio antigenico del C4 che mostra una significativa riduzione tra pazienti con forma lieve e severa della malattia. Se si valutano i dosaggi antigenici di C4 nei pazienti trattati con androgeno attenuati si osserva che le differenze tra pazienti con diversa frequenza di attacchi non raggiungono la significatività. E' noto che l'assetto polimorfico del gene di C4 ne condiziona i livelli plasmatici e probabilmente influenza anche la risposta diretta all'androgeno derivato. Si può concludere che C4 è un buon marcatore dello stato di malattia dei soggetti con AEE, ma il suo valore è limitato nei pazienti in terapia con androgeni.

I livelli plasmatici di chininogeno ad alto peso molecolare clivato risultano significativamente più alti nei pazienti affetti da angioedema ereditario in remissione rispetto ai soggetti normali ed incrementano ulteriormente durante gli attacchi. Il clivaggio dell'HK risulta aumentato in maniera significativa nei pazienti che non effettuano profilassi caratterizzati da più di 12 attacchi all'anno rispetto a quelli con meno di tre attacchi all'anno ed anche rispetto ai soggetti con un numero intermedio di attacchi. Il valore medio dell'HK clivato nei soggetti con forma lieve della patologia (pazienti che hanno presentato meno di 3 attacchi in un anno) non differisce significativamente da quello misurato nei soggetti sani.

Nei pazienti in terapia con androgeno-derivati i livelli di HK clivato sono più elevati in maniera significativa nei soggetti che presentano un'alta frequenza di attacchi rispetto a pazienti con un numero intermedio o basso di episodi di angioedema. Sulla base di questi dati riteniamo di poter concludere che il chininogeno ad alto peso molecolare è un buon marcatore

dello stato di malattia nei soggetti affetti da angioedema ereditario, anche nei pazienti che effettuano terapia con androgeni.

In conclusione i risultati ottenuti mostrano che la determinazione del clivaggio del chininogeno ad alto peso molecolare rappresenta il miglior parametro individuato fino ad ora per definire i diversi stati della malattia in soggetti affetti da angioedema ereditario e può diventare un utile strumento nel monitoraggio dei pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Davis AE III. C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Ann Rev Immunol* 1988;6:595-628
2. Bock SC, Skriver K, Nielsen E, Thøgersen HC, Wiman B, Donaldson VH, Eddy RL, Marrinan J, Radziejewska E, Huber R, Shows TB, Magnusson S. Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry* 1986;25:4292–4301
3. Coutinho M, Aulak KS, Davies AE III. Functional analysis of the serpin domain of C1 inhibitor. *J Immunol* 1994;153:3648-3654
4. Bos I, Hack CE, Abrahams JP. Structural and functional aspects of C1 inhibitor. *Immunobiol.* 2002;205:518-533
5. Harpel PC, Cooper NR Studies on human plasma C1 inactivator–enzyme interactions. *J. Clin. Invest.* 1975;55:593-604
6. Virginia H, Bissler D. C1 Inhibitors and genes: an update. *J. lab. Clin. Med.* 1992;119:330
7. Perkins SJ, Smith KF, Amatayakul S, Ashford D, Rademacher TW, Dwek RA, Lachmann PJ, and Harrison RA. Two-domain Structure of the Native and Reactive Centre Cleaved Forms of Ci Inhibitor of Human Complement by Neutron Scattering *J. Mol. Biol.* 1990;14:751–763
8. Bos I, Lubbers YT, Roem D, Abrahams JP, Hack CE, and Eldering E. The functional integrity of the serpin domain of C1-inhibitor depends on the unique N-terminal domain, as revealed by a pathological mutant *J. Biol. Chem.* 2003;278:29463–29470
9. Davis AE, Whitehead AS et al. Human Inhibitor of the first component of complement C1: characterization of c-DNA clones and localization of the gene to chromosome 11 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986;83:3161-3165

10. Stein P, Carrel L. What do dysfunctional SERPINS tell us about molecular mobility and disease? *Structural Biology* 1995;2:96
11. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 2001;407:923
12. Huntington JA, Carrell RW. The serpins: nature's molecular mousetraps. *Sci.Prog.* 2001;84:125
13. Storm D, Herz J, Trinder P, Loos M. C1 inhibitor-C1s complexes are internalized and degraded by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 1997;272:31043
14. De Smet BJ, De Boer JP, Agterberg J, Rigter G, Bleeker WK, Hack CE. Clearance of human native, proteinase-complexed, and proteolytically inactivated C1-inhibitor in rats. *Blood* 1993;81:56
15. Figueroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:359-95
16. Sim RB, Tsiftoglou SA. Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 2004;32:21-7
17. Sim RB, Laich A. Serine proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 2000;28:545-50
18. Makkrides SC Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev*1998; 50:59-87
19. Hu VW, Esser AF, Podack ER and Wisnieski BJ. The mambrane attack mechanism of complement: Photolabeling reveals insertion of terminal proteins into target membrane. *J Immunol* 1981;127:380-386

20. Podack ER, Müller-Eberhard HJ, Horst H and Hoppe W. Membrane attack complex of complement (MAC): Three-dimensional analysis of MAC-phospholipid vesicle recombinants. *J Immunol* 1982;128:2353–2357
21. Turner MW. Mannose-binding lectin: The pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996;17:532–540
22. Hugli TE and Müller-Eberhard HJ. Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Adv Immunol* 1978;26:1–53
23. Morgan EL. Modulation of the immune response by anaphylatoxins. *Complement* 1986;3:128–136
24. Gerard C and Gerard NP. C5a anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Rev Immunol* 1994;12:775–808
25. Hartmann K, Henz BM, Krüger-Krasagakes S, Köhl J, Burger R, Guhl S, Haase I, Lippert U and Zuberbier T. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood* 1997; 89:2863–2870
26. Bokisch VA and Müller-Eberhard HJ. Anaphylatoxin inactivator of human plasma: Its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J Clin Invest* 1970;49:2427–2436
27. Sim RB, Reboul A, Arlaud GJ, Villiers CL and Colomb MG. Interaction of I125-labelled complement subcomponents C1r and C1s with protease inhibitors in plasma. *FEBS Lett* 1979;97:111–115
28. Schapira M, de Agostini A, Schifferli JA and Colman RW. Biochemistry and pathophysiology of human C1 inhibitor: Current issues. *Complement* 1985;2:111–126
29. Schmaier AH. Contact activation: A revision. *Thromb Haemost* 1997;78:101–107
30. Kaplan AP, Joseph K, and Silverberg M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:195-209

31. Joseph, K, Tholanikunnel BG, and Kaplan AP. Heat shock protein 90 catalyzes activation of the prekallikrein-kininogen complex in the absence of factor XII. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:896-900
32. Shariat-Madar Z, Mahdi F, and Schmaier AH. Recombinant prolylcarboxypeptidase activates plasma prekallikrein. *Blood* 2004;103:4554-4561
33. Davis AE, 3rd. The pathophysiology of hereditary angioedema. *Clin Immunol* 2005;114:3-9
34. Schneider L, Lumry W, Vegh A, Williams AH, and Schmalbach T. Critical role of kallikrein in hereditary angioedema pathogenesis: A clinical trial of ecallantide, a novel kallikrein inhibitor. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:416-422
35. Dobò J, Major B, Kékesi KA, Szabò I, Megyeri M, Hajela K, Juhász G, Závodszy P, Gál P. Cleavage of kininogen and subsequent bradykinin release by the complement component: mannose binding lectin-associated serine protease (MASP)-1. *PLoS ONE* 2011;6:e20036
36. Colman RW, Pixley RA, Najamunnisa S, et al. Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest* 1997;100:1481-1487
37. Joseph K, Ghebrehiwet B, Peerschke EI, et al. Identification of the zinc-dependent endothelial cell binding protein for high molecular weight kininogen and factor XII: identity with the receptor that binds to the globular "heads" of C1q (gC1qR). *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8552-8557
38. Hasan AA, Zisman T, Schmaier AH. Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3615-3620

39. Pixley RA, Espinola RG, Ghebrehiwet B, Joseph K, Kao A, Bdeir K, Cines DB, Colman RW. Interaction of high molecular weight kininogen with endothelial cell binding proteins suPAR, gC1qR and cytokeratin 1 determined by surface plasmon resonance (BiaCore). *Thromb Haemost* 2011; 105:1053-1059
40. Colman RW, Bagdasarian A, Talamo RC, et al. Williams trait. Human kininogen deficiency with diminished levels of plasminogen proactivator and prekallikrein associated with abnormalities of the Hageman factor-dependent pathways. *J Clin Invest* 1975;56:1650-1662
41. Jacobsen S, Kriz M. Some data on two purified kininogens from human plasma. *Br J Pharmacol* 1967;29:25-36
42. Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, Takagaki Y, Miyata T, and Nakanishi, S. Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J. Biol. Chem.* 1985;260:8610-8617
43. Colman RW. Structural biology of high molecular weight kininogen. *Pure & Appl. Chem.* 1994;66:27-34
44. Mandle RJ, Colman RW, Kaplan AP. Identification of prekallikrein and high molecular weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:4179-4183
45. Colman RW, Silver LD, Purdon AD, et al. Regulation of the coagulant activity and surface binding of high molecular weight kininogen. *Trans Assoc Am Physicians* 1984;97:113-123
46. Quincke HI. Uber akutes umschriebenes Hautodem. *Monatshe Prakt Dermatol* 1882;1:129-31
47. Osler W. Hereditary angio-neurotic oedema. *Am J Med Sci* 1888;95:362-7
48. Pensky J, Levy LR, Lepow IH. Partial purification of serum inhibitor of C1 esterase. *J Biol Chem* 1961;236:1674-1679

49. Donaldson VH, Evans RR. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema: absence of serum inhibitor of C1 esterase. *Am J Med* 1963;35:37-44
50. Gompels M, Lock R, Abinun M, Bethune CA, Davies G, Grattan C et al. C1 inhibitor deficiency: consensus document. *Clin Exp Immunol* 2005;139:379-94
51. Carter PE, Duponchel C, Tosi M, Fothergill JE. Complete nucleotide sequence of the gene for human C1 inhibitor with an unusually high density of Alu elements. *Eur. J. Biochem.* 1991;197: 301–308
52. Kalmar L, Hegedus T, Farkas H, Nagy M, Tordai A. HAEdb: a novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene. *Hum. Mutat.* 2004;25:1–5
53. Agostoni A, Cicardi M. Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 pa. *Medicine* 1992;71:206-15
54. Stoppa-Lyonnet D, Duponchel C, Meo T, Laurent J, Carter PE, Arala-Chaves M, et al. Recombinational biases in the rearranged C1-inhibitor genes of hereditary angioedema patients. *Am J Hum Genet* 1991; 9:1055-62
55. Stoppa-Lyonnet D, Carter PE, Meo T, Tosi M. Cluster of intragenic Alu repeats predispose the human C1-INH locus to deleterious rearrangements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1551-5
56. Ariga T, Carter PE, Davis AE III. Recombinations between Alu repeat sequences that result in partial deletions within the C1 inhibitor gene. *Genomics* 1990;8:607-13
57. Bork K, Wulff K, Hardt J, Witzke G, Staubach P. Hereditary angioedema caused by missense mutations in the factor XII gene: clinical features, trigger factors, and therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:129-34
58. Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:1286-9

59. Cichon S, Martin L, Hennies H, Müller F, Van Driessche K, Karpushova A, et al. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet* 2006;79:1098-104
60. Zingale LC, Castelli R, Zanichelli A, Cicardi M. Acquired deficiency of the inhibitor of the first complement component: presentation, diagnosis, course, and conventional management. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26(4): 669-90
61. Zingale L, Beltrami L, Zanichelli A, Maggioni L, Pappalardo E, Cicardi B, Cicardi M. Angioedema without urticaria: a large clinical survey. *CMAJ* 2006; 175;9:1065-70
62. Carugati A, Pappalardo E, Zingale LC, Cicardi M. C1-inhibitor deficiency and angioedema. *Mol Immunol* 2001;38:161-173
63. Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, et al.: Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(3 Suppl): S51-131
64. Prematta M, Gibbs JG, Pratt EL, Stoughton TR, Craig TJ: Fresh frozen plasma for the treatment of hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 98(4): 383-8
65. Pekdemir M, Ersel M, Aksay E, Yanturali S, Akturk A, Kiyan S: Effective treatment of hereditary angioedema with fresh frozen plasma in an emergency department. *J Emerg Med* 2007; 33(2): 137-9
66. Blohme G: Treatment of hereditary angioneurotic oedema with tranexamic acid. A random double-blind cross-over study. *Acta Med Scand* 1972; 192(4): 293-8
67. Frank MM, Sergent JS, Kane MA, Alling DW. Epsilon aminocaproic acid therapy of hereditary angioneurotic edema. A double-blind study. *N Engl J Med* 1972; 286(15): 808-12

68. Sheffer AL, Austen KF, Rosen FS. Tranexamic acid therapy in hereditary angioneurotic edema. *N Engl J Med* 1972; 287(9): 452-4
69. Eldering E, JH Nuijens, CE Hack. Expression of functional human C1 inhibitor in COS cells. *J Biol Chem* 1988;263(24):11776–11779
70. Lamark T, Ingebrigtsen M, Bjornstad C et al. Expression of active human C1 inhibitor serpin domain in escherichia coli. *Protein Expr Purif* 2001;22(2):349–358
71. Antoniu SA. Therapeutic approaches in hereditary angioedema. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2011; 41:114–122
72. Cugno M, Zanichelli A, Foini F, Caccia S, Cicardi M. C1-inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress. *Trends Mol Med* 2009;15(2):69–78
73. Bernstein JA. Hereditary angioedema: a current state-of the-art review, VIII: current status of emerging therapies. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;100(1 Suppl 2):S41–S46
74. Bernstein JA, Qazi M. Ecallantide: its pharmacology, pharmacokinetics, clinical efficacy and tolerability. *Expert Rev Clin Immunol* 2010;6(1):29–39
75. Landerman NS, Webster ME, Becker EL, Ratcliffe HE. Hereditary angioneurotic edema. Deficiency of inhibitor for serum globulin permeability factor and/or plasma kallikrein. *J Allergy* 1962;33:330–341
76. Schapira M, Silver D, Scott CF, Schmaier AH, Prograis LJ, Curd JG Jr, Colman RW. Prekallikrein activation and high-molecular-weight kininogen consumption in hereditary angioedema. *N Engl J Med* 1983;308:1050-1053
77. Curd JG, Prograis LJ Jr, Cochrane CG. Detection of active kallikrein in induced blister fluids of hereditary angioedema patients. *J Exp Med* 1980;152:742-747
78. Cugno M, Hack CE, de Boer JP, Eerenberg AJ, Agostoni A, Cicardi M. Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema. *J Lab Clin Med* 1993;121:38–43

79. Shoemaker LR, Schurman SJ, Donaldson VH, Davis AE III. Hereditary angioneurotic oedema: characterization of plasma kinin and vascular permeability-enhancing activities. *Clin Exp Immunol* 1994;95:22-28
80. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 1998;351:1693–1697.
81. Kleniewski J, Blankenship DT, Cardin AD, Donaldson VH. Mechanism of enhanced kinin release from high molecular weight kininogen by plasma kallikrein after its exposure to plasmin. *J Lab Clin Med* 1992;120:129–139
82. Scott CF, Shull B, Müller-Esterl W, Colman RW. Rapid direct determination of low and high molecular weight kininogen in human plasma by particle concentration fluorescence immunoassay (PCFIA), *Thromb. Haemostasis* 1997;77:109-118
83. Berrettini M, Lammle B, White T, Curd J, Griffin, JH. Detection of the in vivo cleavage of high molecular weight kininogen in human plasma by immunoblotting with monoclonal antibodies. *Blood* 1986;68:455-462
84. Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, Coppola R, Paonessa R, Mannucci PM, Agostoni A. Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood* 1997;89:3213-3218
85. Csuka D, Füst G, Farkas H, Varga L. Parameters of the classical complement pathway predict disease severity in hereditary angioedema. *Clinical Immunology* 2011;139:85–93
86. Blasko B, Szeplaki G, Varga L, et al.: Relationship between copy number of genes (C4A, C4B) encoding the fourth component of complement and the clinical course of hereditary angioedema (HAE). *Mol Immunol* 2007; 44(10): 2667-74.
87. Pitts JS, Donaldson VH, Forristal J, Wyatt RJ. Remissions induced in hereditary angioneurotic edema with an attenuated androgen (danazol): correlation between

- concentrations of C1-inhibitor and the forth and second components of complement. *J Lab Clin Med.* 1978 Oct;92(4):501-7
88. Fabiani JE, Paulin P, Simkin G, Leoni J, Palombarani S, Squiquera L: Hereditary angioedema: therapeutic effect of danazol on C4 and C1 esterase inhibitors. *Ann Allergy* 1990; 64(4): 388-92.
89. Joseph K, Tuscano TB, Kaplan AP. Studies of the mechanisms of bradykinin generation in hereditary angioedema plasma. *Ann Allergy Asthma and Immunol.* 2008;101:279-286
90. Cugno M, Zanichelli A, Bellatorre AG, Griffini S, Cicardi M. Plasma biomarkers of acute attacks in patients with angioedema due to C1 inhibitor deficiency. *Allergy* 2009;64:254-257