



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTA' di MEDICINA E CHIRURGIA

Scuola di dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali

Dottorato di ricerca in Metodologia Clinica

ELEVATA PREVALENZA DI LINFOMI INDOLENTI B CELLULARI NON
FOLLICOLARI (INFBCL) IN PAZIENTI AFFETTI DA CARENZA
ACQUISITA DI INIBITORE DELLA C1- ESTERASI.

Roberto Castelli

R09976

Correlatore: Chmo. Prof Marco Cicardi

Anno Accademico 2014-2015

“Noi non siamo soli e la speranza si nutre dell’amore di chi continua a vegliare su di noi”.

Dedico a Te papà questo lavoro a te che mi hai insegnato a lavorare con onestà ed impegno, non a parole ma con l’esempio. Anche se io non sempre l’ho capito.

Dedico a voi Simone e Sofia questo lavoro perché spero di trasmettervi la curiosità per le cose del mondo.

Dedico a Te, Laura, che vegli sempre su di noi

Indice

	Pag
1. Riassunto	5-7
2. Introduzione e fisiopatologie delle carenze acquisite di C1 inibitore	8-12
3. Caratteristiche cliniche delle carenze acquisite di C1-inibitore	
3.1 Presentazione clinica	13
3.2 Diagnosi	14-15
3.3 Decorso clinico	16
3.4 Terapia	16- 20
4. Relazioni tra malattie linfoproliferative e carenze acquisite di C1-INH	21-24
5 Algoritmo diagnostico delle sospette carenze di C1-INH	25-27
6. Lavoro sperimentale	28

7. Introduzione	29-33
8. Scopo dello studio	34- 35
9. Materiali e metodi	35-37
10.Risultati	38-45
11.Discussione	46-50
12. Future direzioni	51- 54
13.Riferimenti bibliografici	55-67

Riassunto

I linfomi della zona marginale sono malattie linfoproliferative rare, e rappresentano, nella popolazione generale, circa il 10% di tutti i linfomi non Hodgkin. I pazienti con carenza acquisita di inibitore della C1 esterasi, rappresentano una popolazione ad elevato rischio di sviluppare malattie linfoproliferative, si calcola infatti che il 33% di tali pazienti presenta o presenterà una malattia linfoproliferativa conclamata.

In questo studio abbiamo valutato una casistica di 72 pazienti affetti da carenza acquisita di inibitore della C1 esterasi seguiti nel nostro centro per 15 anni (range 1-24 anni) allo scopo di valutare la prevalenza della malattie linfoproliferative in tale popolazione e se particolari istotipi di malattia linfoproliferativa prevalgono in questa popolazione rispetto alla popolazione generale. I pazienti presentano una età mediana di 71 anni (range 64-79 anni), l'età mediana all' insorgenza dei sintomi è di 57,5 anni (range 50-66 anni).

Ventiquattro pazienti presentavano malattie linfoproliferative. Venti pazienti presentavano malattie linfoproliferative indolenti di tipo non follicolare (il 75% costituito da linfomi marginali splenici), un paziente ha presentato un linfoma follicolare, mentre tre pazienti hanno presentato malattie linfoproliferative ad elevato grado di malignità (2 linfomi diffusi a grandi cellule B ed un linfoma

mantellare). La malattia linfoproliferativa è stata diagnosticata all' insorgenza dei sintomi di angioedema in 15 pazienti nei rimanenti durante il decorso dell'angioedema.

2 dei 24 pazienti sono in "watchful wait" pertanto allo stato attuale non ricevano alcun trattamento per la malattia linfoproliferativa. 13 pazienti hanno ricevuto un trattamento chemioterapico e due pazienti sono stati trattati con Rituximab. La sola splenectomia è stata effettuata in 3 pazienti.

Tutti i pazienti trattati per la malattia linfoproliferativa con trattamento chemio/immunoterapico o splenectomia hanno sperimentato un miglioramento dei sintomi clinici di angioedema o un miglioramento dei parametri complementari.

Il nostro studio suggerisce che, i pazienti con carenza acquisita di C1-inibitore hanno una elevata prevalenza di linfomi della zona marginale rispetto alla popolazione generale. L' origine post-germinale di tali malattie linfoproliferative, suggerisce che la stimolazione antigenica continua svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi di tale condizioni.

La proliferazione clonale B cellulare rappresenta un denominatore comune nei pazienti con carenza acquisita di C1-inibitore sia nei pazienti che presentano

anticorpi inattivanti C1 inibitore che in quelli che sviluppano malattia linfoproliferativa.

Introduzione, ceni storici e fisiopatologia delle carenza acquisite di C1-inibitore.

Le caratteristiche cliniche delle carenze acquisite di C1 inibitore (AAE) sono simili alle forme ereditarie (HAE), differiscono, tuttavia da quest' ultime per l'insorgenza dei sintomi in tarda età, l'assenza di storia familiare per sintomi di angioedema, e per la potenziale associazione con malattie linfoproliferative e/o la presenza di anticorpi anti C1- Inibitore [1-2].

Singole segnalazioni indicano che l'angioedema acquisito può associarsi a neoplasie non ematologiche, infezioni o malattie autoimmuni [2].

I sintomi includono ricorrenti episodi di angioedema localizzati al tessuto sottocutaneo (potenzialmente deformanti), alle vie aeree superiori (potenzialmente fatali se interessano la laringe) ed il tratto gastrointestinale (responsabile di occlusione intestinale e gravi coliche addominali). [2-4].

La carenza di C1-inibitore determina l'attivazione continua della via classica del complemento ed il consumo di C1, C2 e C4, inoltre l'instabilità del sistema di contatto dovuto alla carenza di C1-INH, determina produzione di callicreina, che cliva il chininogeno ad alto peso molecolare (HK) determinando generazione di bradichinina il mediatore della alterata permeabilità vascolare [5-10]. La produzione di bradichinina è facilitata dalla

plasmina generata, nei pazienti con AEE e HAE, durante gli attacchi acuti. [10-12].

Il meccanismo che induce consumo di C1-INH nelle carenze acquisite, è stato studiato approfonditamente [1, 13-15], ed esperimenti preliminari hanno evidenziato che la carenza di C1-INH o il consumo della via classica del complemento è determinata dal tessuto linfatico patologico, o dalla presenza di anticorpi inibenti/ inattivanti C1-INH.

Infatti nella maggior parte dei pazienti con AEE è presente un disordine linfoproliferativo responsabile del consumo di C1-INH, tale disordine comprende gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS) e linfomi non Hodgkin. (LNH). [16-19].

La prima descrizione di carenza acquisita di C1-INH in associazione a malattia linfoproliferativa è fatta da Caldwell et al nel 1972.

Nel 1986 Jackson et al, scoprì una immunoglobulina Ig G reattiva contro C1-INH in un paziente con AEE. [13]. Questa ed altre scoperte hanno suggerito una possibile relazione tra autoimmunità, linfoproliferazione e AEE.

Alcuni esperimenti hanno evidenziato che C1-INH ed elementi della via classica del complemento erano consumati dal tessuto linfatico neoplastico.

Schriber et al [14], hanno descritto un paziente con malattia linfoproliferativa, sintomi di angioedema acquisito e consumo di C1-INH. In tale paziente veniva riportato che i monociti di tale paziente ed una sospensione cellulare derivata da alcuni infiltrati polmonari erano in grado di determinare consumo della via classica del complemento e di C1-INH. Nel 1979, Hauptmann et al, [15] hanno studiato un paziente affetto da linfosarcoma splenico con interessamento nodale, ipogammaglobulinemia e profilo complementare compatibile con AEE. Studi immunoistochimici hanno dimostrato che il tessuto linfatico patologico determinava consumo di C1-INH.

Geha et al. [20] hanno descritto un paziente con carenza acquisita di C1 inibitore che presentava una paraproteina in cui sono stati evidenziati anticorpi/ immunocomplessi Ig/ anti idiotipo fissanti ed inibenti C1-INH. Tuttavia altri successivi esperimenti non hanno confermato tale riscontro.

Poiché autoanticorpi anti C1-INH erano stati riscontrati anche in pazienti senza evidenza di malattia linfoproliferativa, le carenze acquisite di C1-inibitore storicamente sono state classificate in due forme: una forma paraneoplastica associata per lo più a malattie linfoproliferative (tipo I) ed una forma associata a fenomeni autoimmunitari (tipo II). Al momento attuale, vista l'evidenza di possibile coesistenza delle due forme e della possibile evoluzione di una forma

in un'altra, tale distinzione è stata superata e la classificazione abbandonata. [21].

Un consistente numero di studi ha cercato di evidenziare il meccanismo con cui gli anticorpi consumano C1-INH. Esperimenti con peptidi lineari, hanno suggerito che gli anticorpi si legano ad epitopi vicino al sito reattivo di C1-inibitore [22]. Questo legame può sia creare un impedimento sterico alla formazione del complesso C1-INH protease e/o convertire C1- inibitore ad un substrato su cui agiscono le proteasi. Questo spiegherebbe le elevate concentrazioni di C1-INH clivato ed inattivo presente nel siero di pazienti con AAE. [23-24]. Zuraw e Curd [23] hanno dimostrato che il clivaggio di C1-INH principalmente dipende dall'attivazione del sistema di contatto piuttosto che dall' attivazione del sistema complementare.

I ridotti livelli di C1-INH legato o al consumo da parte del tessuto linfatico patologico o l' inattivazione indotta dalla presenza di anticorpi anti C1-INH determinano una iperattivazione del complemento e del sistema di contatto che determina un ulteriore consumo di C1-inibitore [24].

I sistemi di contatto e del complemento sono leggermente attivati nelle carenze acquisite di C1-INH durante le fasi di remissione, ma iperattivati durante gli attacchi acuti. [10].

L'iperattivazione del Sistema di contatto, conduce alla generazione di bradichinina che aumenta la vasopermeabilità e determina angioedema.

L'attivazione del sistema di contatto inizia con l'attivazione del fattore XII, che trasforma la pre-kallicreina a kallicreina. La kallicreina attiva il fattore XII, che agisce sul chinogeno ad alto peso molecolare determinando formazione di bradichinina [25].

Di fatto C1-inibitore non solo inibisce il complemento, il sistema di contatto, ed il sistema fibrinolitico, ma anche la coagulazione [26-29] che sembra essere attivata in pazienti con carenza di C1-inibitore.

Studi sperimentali hanno dimostrato che la trombina aumenta la permeabilità vascolare, [30-32] e può essere inibita da C1-INH, specialmente sulle superfici endoteliali suggerendo il suo possibile ruolo nella formazione dell'angioedema. [33].

Caratteristiche cliniche delle carenze acquisite di C1-inibitore

Presentazione clinica:

I sintomi tipici sia delle carenze ereditarie e acquisite di C1-INH sono costituiti da edemi autolimitantesi, non pruriginosi, non improntabili che si autolimitano nell'arco di 1-5 giorni. [2-33-34]. L'angioedema interessa il tessuto sottocutaneo, la mucosa gastrointestinale, e la mucosa delle vie aeree superiori. L'angioedema cutaneo e sottocutaneo, può interessare la faccia, i genitali, le natiche e le estremità. L'orticaria è generalmente assente, sebbene transitori episodi orticarioidi ((erythema marginatum) possono comparire seppure raramente. L'angioedema ai tessuti sottocutanei e cutanei, crea fastidio a paziente, può danneggiare la vita di relazione nel caso di interessamento del volto, o può interessare gli arti. [2]. Gli attacchi addominali, dovuti ad angioedema della parete intestinale, determinano dolore addominale di tipo colico e più raramente diarrea. Questi sintomi in genere si risolvono spontaneamente entro due giorni. La disfagia, i cambiamenti della voce, e lo stridor respiratorio sono invece segni di interessamento della mucosa delle vie aeree superiori e possono esitare in asfissia se vi è edema della glottide. Questa condizione è potenzialmente fatale e richiede terapia medica immediata.

Diagnosi

Il sospetto clinic deve essere immediatamente confermato da indagini di laboratorio.

La tabella I mostra i criteri clinici e laboratoristici essenziali per la diagnosi di carenza acquisita di C1-INH.

Tabella 1. Dati clinici e di laboratorio per la diagnosi di carenze acquisite di C1-INH

Dati clinici Angioedemi recidivanti, non pruriginosi, che durano per più di 12 ore Dolori addominali di tipo colico della durata superiore uguale a 6 ore Edemi laringei ricorrenti
Dati di laboratorio Livelli antigenici di C1-INH <50% in due misurazioni separate Livelli di C1-INH funzionali <50% in due misurazioni separate Livelli di C1q <50% in due misurazioni separate * -Presenza di autoanticorpi leganti C1-INH o inibenti la funzione di C1-INH

* I livelli di C1q in alcuni soggetti possono essere normali.

Il quadro tipico della carenza acquisita di C1-INH è rappresentato da bassi livelli plasmatici di C1-INH funzionali ed antigenici, ridotti livelli di C4 e C1q, normali livelli di C3. Una minoranza di pazienti presenta normali livelli di C1q. I livelli antigenici di C1 inibitore, C4, C3 e C1q vengono misurati mediante immunodiffusione radiale o nefelometria. I livelli funzionali di C1-INH vengono misurati quantificando la capacità del plasma di inibire l'attività esterasica di quantità fisse di C1s mediante un substrato cromogenico, o mediante un test immunoenzimatico [2].

].

Terapia

Il trattamento dell'AAE è un trattamento su più fronti. Essendo una malattia rara e per lo più piuttosto conosciuta anche ai medici, gli stessi pazienti devono essere educati ad evitare i potenziali eventi scatenanti quali stress psicologico ed alcuni farmaci (estrogeni, tamoxifene, Ace-inibitori) che possono precipitare o aggravare la frequenza degli attacchi acuti.

Pazienti e medici devono essere consapevoli che, sebbene rari, sintomi di angioedema possono insorgere in pazienti con una nota malattia linfoproliferativa. Il riconoscimento precoce dei sintomi, gioca un ruolo fondamentale nel trattamento delle carenze acquisite di C1-INH, ed i pazienti dovrebbero essere istruiti, mediante indicazioni scritte da parte dei curanti dei centri addetti al loro trattamento, specie in caso edema della glottide. Vista l'assenza di studi clinici controllati e vista l'assenza di farmaci specificamente registrati per il trattamento di questa condizione, il trattamento dell'AAE viene estrapolato dal trattamento della forma ereditaria che invece possiede un trattamento standardizzato grazie a studi clinici condotti su reti di pazienti. [37].

Il trattamento con epinefrina, glucocorticoidi, o antistaminici non trova indicazione nel trattamento dell'angioedema da carenza acquisita di C1-INH.

Il trattamento di prima linea nelle forme da carenza acquisita di C1-INH è rappresentato dal trattamento sostitutivo con concentrato di inibitore della C1-esterasi sia esso di derivazione plasmatica come avveniva in passato o attraverso forme ricombinanti attualmente disponibili in Europa. (Cynerize o Beherinert). Il dosaggio prevede un trattamento con 20 unità / kg di C1-INH ricombinante (disponibile in Europa ed USA con il nome commerciale di Ruconest o Rhucin) o con il derivato Cynerize (al dosaggio 1000 U all'insorgenza dei sintomi seguito da una dose di 1000U entro 1 ora nei pazienti non responsivi).

Il trattamento con concentrati plasmatici di C1-INH è particolarmente indicato negli edemi della parete intestinale, quando è necessaria la diagnosi differenziale con addomi acuti chirurgici o durante la gravidanza quando l'uso di androgeno derivati è controindicato.

E' noto che nel corso del tempo i pazienti possono sviluppare una relativa resistenza al trattamento con concentrato di C1-INH, o richiedere dosi superiori di farmaco rispetto ai pazienti con carenza ereditaria. Tale fenomeno

sembra essere dovuto al clivaggio da parte degli autoanticorpi anti C1-INH. [37].

L'utilizzo dell'Icatibant, un antagonista selettivo dei recettori B2 della bradichinina, (disponibile in USA, Europa ed altri paesi con il nome commerciale di Fyrazir) rappresenta un'utile alternativa alla terapia sostitutiva con concentrati di C1-INH. [38]. Il farmaco determina una efficace attenuazione dei sintomi, è generalmente ben tollerato e permette di bypassare il problema dell'ipercatabolismo di C1-INH indotto dalla presenza degli anticorpi anti C1-INH, inoltre la somministrazione sottocutanea del farmaco (30 mg sc) preferibilmente nella regione addominale, permette una facile auto somministrazione. Negli USA è inoltre disponibile l'Eccallantide, un inibitore della kallikreina, e può essere somministrato ai pazienti resistenti al trattamento sostitutivo con concentrato di C1-INH. [39]. Studi recenti hanno riportato come l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale anti CD 20 Rituximab sia efficace nei pazienti con malattia linfoproliferativa indolente nel controllare i sintomi dell'AAE. Il trattamento con Rituximab a dosi standard ha determinato una riduzione dei sintomi di angioedema ed una riduzione del titolo anticorpale. [40-42]. Riteniamo tuttavia che l'utilizzo del Rituximab sia giustificato, in associazione o meno con trattamento chemioterapico in

presenza di una patologia linfoproliferativa o solo nei rari casi di impossibilità a controllare i sintomi dell'angioedema con le terapie attualmente disponibili. Altro cardine del trattamento delle carenze acquisite di C1-INH è rappresentato dai farmaci antifibrinolitici. Il razionale del loro uso si basa sul fatto che l'attivazione della fibrinolisi è responsabile della produzione di bradichinina il principale mediatore dell'aumento della permeabilità vascolare. Vengono somministrati al dosaggio di tre grammi al giorno per via orale e possono rappresentare anche un trattamento efficace nel ridurre la frequenza degli attacchi. Il loro utilizzo è preferibile nei bambini, nelle donne e nei pazienti che non tollerano gli androgeno-derivati. Nei pazienti con diatesi trombofilica o con patologie acquisite che li esponcano ad un elevato rischio trombotico il loro utilizzo in associazione a farmaci anticoagulanti è da consigliarsi. Gli androgeno derivati (danazololo e stanazololo) sono altamente efficaci sia nella profilassi a breve termine che nella profilassi a lungo termine. Si ritiene che inducano un aumento della sintesi epatica di C1-INH. Il dosaggio medio nella profilassi degli attacchi è di circa 200 mg. La conoscenza di possibili effetti collaterali impongono durante il loro trattamento un attento controllo degli indici di citolisi epatica, profilo lipidico, controllo dei valori di

pressione arteriosa, controllo del peso corporeo, e controllo ecografico epatico con cadenza semestrale o annuale.

Gli androgeno derivati, ovviamente, possono essere responsabili di irregolarità mestruali, irsutismo, e possono determinare segni di virilizzazione.

Relazione tra carenza acquisita di inibitore della C1-esterasi e malattie linfoproliferative

La maggior parte dei pazienti con AAE, presenta una patologia B cellulare che si pensa essere la causa del consumo di C1-INH.

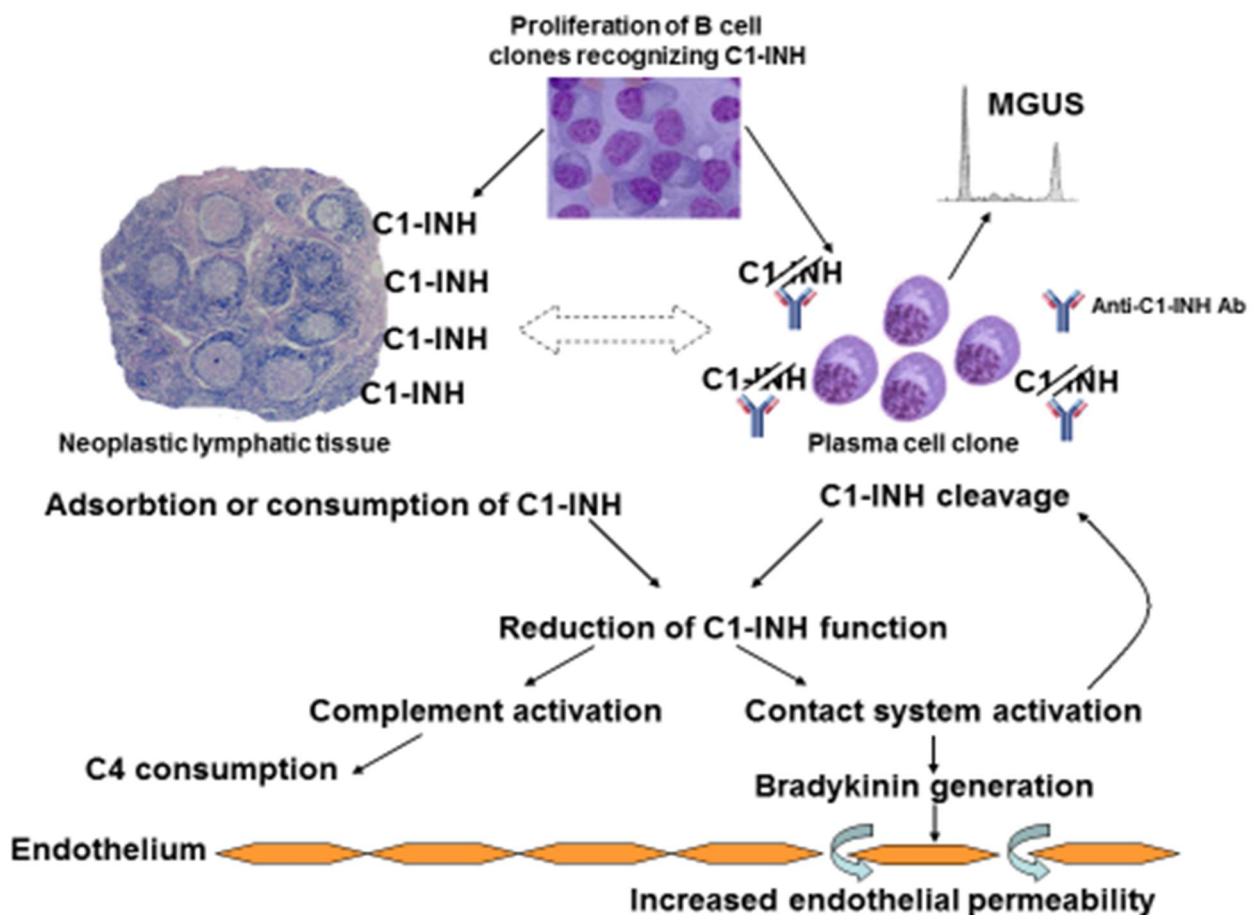
Tali patologie B cellulari spaziano dalla sola produzione di anticorpi anti-C1-INH in assenza di patologie ematologiche, alla gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS), alle patologie linfoproliferative conclamate. Le principali patologie linfoproliferative sono costituite dai linfomi non Hodgkin (LNH) indolenti. Studi del nostro gruppo hanno evidenziato che i pazienti con AAE presentano, rispetto alla popolazione generale, un elevato rischio di sviluppare malattie linfoproliferative conclamate [43-45]. Le malattie linfoproliferative possono presentarsi all'insorgenza dei sintomi di AAE o insorgere dopo tempo. I dati della nostra casistica indicano da 3 mesi a 7 anni. [45].

I più frequenti linfomi nei pazienti con AAE, secondo la classificazione WHO, sono rappresentati da linfomi marginali splenici e nodali, linfomi linfoplasmocitici/ M di Waldenström. Tali istotipi di linfomi prevalgono anche

in alcune patologie autoimmuni, quali la crioglobulinemia e l'artrite reumatoide suggerendo in tali patologie un meccanismo di linfomagenesi antigene- mediato. In genere il trattamento della malattia linfoproliferativa di base si associa ad un miglioramento della sintomatologia clinica dell'angioedema e/o un miglioramento fino alla normalizzazione dei parametri complementari.

La prevalenza di MGUS nella popolazione AAE è 35%, mentre nella popolazione generale è approssimativamente del 3% [46]. Uno studio del nostro gruppo ha evidenziato come spesso pazienti con MGUS ed anticorpi anti C1-INH presentano la stessa catena leggera o pesante sia nelle immunoglobuline monoclonali che negli anticorpi anti C1-INH. [45].

Figura 1: Riassunto dei possibili eventi implicati nella patogenesi delle carenze acquisite di C1 inibitore.



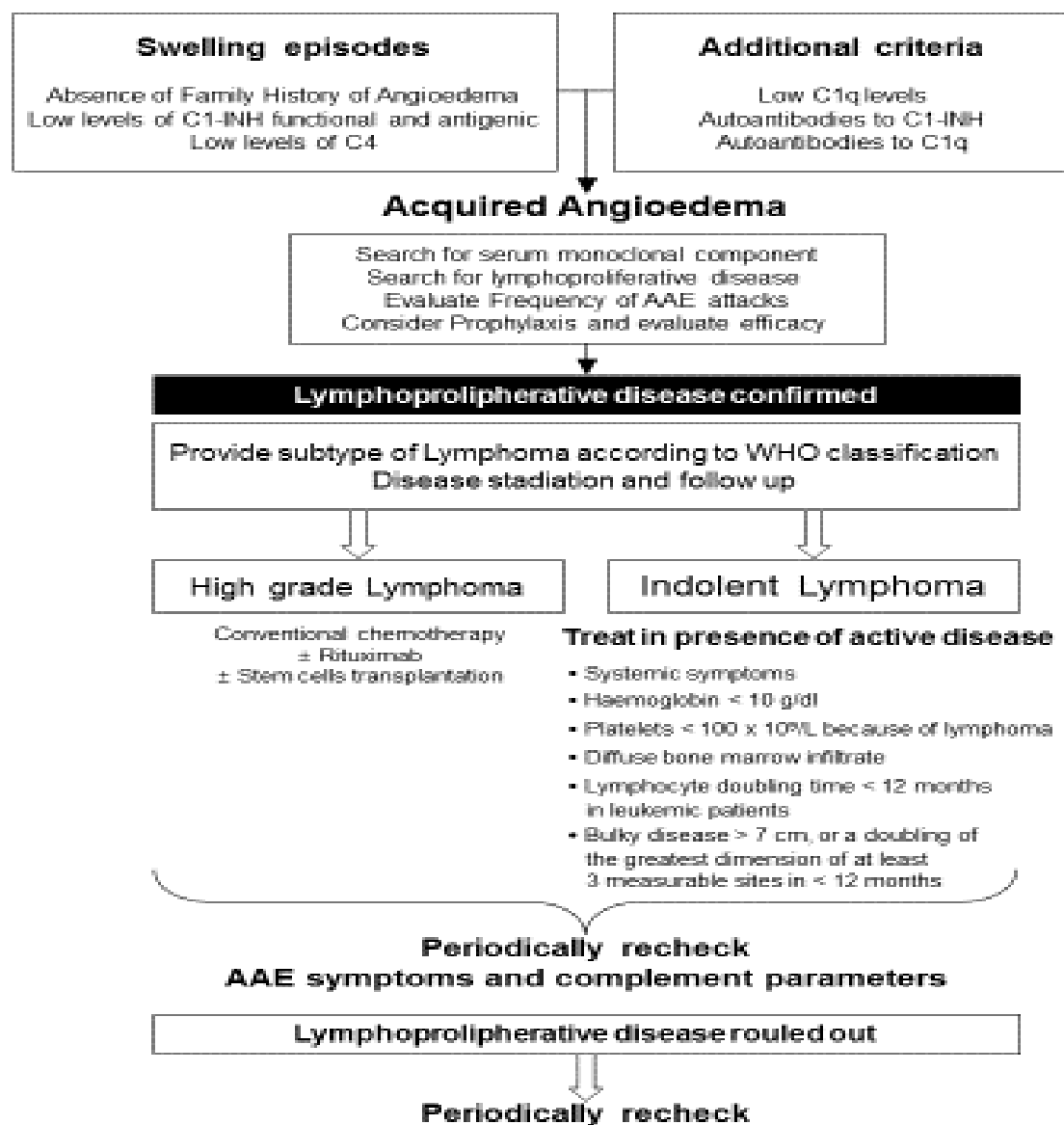
La proliferazione di cloni B cellulari che riconoscono C1-INH può produrre anticorpi anti C1-INH che inattivano la molecola di C1-INH legandosi in prossimità del sito reattivo di C1 inibitore. La sua carenza rende instabile il sistema complementare, che attivato determina un consumo dei fattori della via classica del complemento. La carenza di C1-inibitore attiva inoltre sistema di contatto con la produzione di bradichinina che attualmente è riconosciuto come il principale mediatore dell'aumento della permeabilità vascolare.

Il tessuto neoplastico linfatico può inoltre interagire con C1-INH consumandolo, la sua carenza attiva pertanto il sistema complementare e ed il sistema di contatto producendo bradichinine determinando un incremento della permeabilità vascolare. L'associazione tra MGUS e carenza acquisita è

ben nota in letteratura, esistono inoltre evidenze che molti pazienti con MGUS ed anticorpi anti C1-INH presentano le stesse catene leggere o pesanti

Algoritmo diagnostico terapeutico nel sospetto di Carenza acquisita di C1-INH

Figura 2 Algoritmo diagnostico e terapeutico in caso di sospetta malattia linfoproliferativa associata a carenza acquisita di C1-INH



In presenza di episodi recidivanti di angioedema cutanei, addominali o laringei suggestivi per una carenza acquisita (assenza di storia familiare di

angioedema, bassi livelli di C4 e di C1-INH antigenici e funzionali), si può procedere alla determinazione di anticorpi anti- C1-INH, alla determinazione di C1q e di anticorpi anti C1q.

Se si conferma la diagnosi di carenza acquisita di C1- INH è necessario ricercare una componente monoclonale all' elettroforesi, ricercare segni di malattia linfoproliferativa mediante TAC total body. In presenza di segni clinici suggestivi per malattia linfoproliferativa è necessario provvedere ad una biopsia linfonodale per classificare la malattia linfoproliferativa secondo i criteri WHO. E' altresì necessario valutare la frequenza degli attacchi di angioedema e valutare l'indicazione ad un trattamento profilattico degli attacchi di angioedema. Valutare periodicamente l' efficacia degli attacchi.

In presenza di una confermata malattia linfoproliferativa il trattamento non differisce nei pazienti con AAE rispetto alla popolazione generale. Nei pazienti con istotipo suggestivo di malattia linfoproliferativa ad alto grado di malignità è necessario procedere al trattamento dopo aver condotto una adeguata stadiazione della malattia linfoproliferativa. Nei pazienti con malattia a basso grado di malignità, poiché non vi è dimostrazione che il trattamento precoce

della malattia determini dei vantaggi in termini di sopravvivenza, si procede a trattamento solo in caso di malattia linfoproliferativa attiva. Considera la possibilità che in corso di trattamento chemioterapico la sintomatologia dell'angioedema ed i parametri del complemento possono migliorare.

Se la malattia linfoproliferativa è stata esclusa periodicamente rivaluta il paziente con esami ematochimici

In presenza di MGUS rivaluta periodicamente (ogni 3 mesi il primo anno, ogni sei mesi il secondo anno, annualmente dal 3 anno in poi) gli esami ematochimici, la proteinuria di Bence Jones, le Immunoglobuline, la funzionalità renale. In presenza di MGUS IgM valuta la possibilità di eseguire con cadenza annuale Rx torace ed ecografia addominale.

LAVORO SPERIMENTALE

Introduzione

La relazione tra patologie autoimmuni e malattie linfoproliferative è complessa e bidirezionale: disordini autoimmuni possono evolvere in malattia linfoproliferativa e linfoproliferazioni clonali possono esprimersi con auto reattività [47]. Alla base di entrambe le patologie vi è un alterato controllo della proliferazione linfocitaria derivante da anomalie dell'interazione T/B e dei segnali di costimolazione dipendenti dal microambiente midollare.

Lo spettro di manifestazioni autoimmuni che possono svilupparsi nel corso di patologie linfoproliferative è estremamente ampio: citopenie autoimmuni, anemia emolitica, deficit acquisito di fattori della coagulazione, sviluppo di autoanticorpi diretti contro progenitori della linea eritroide, malattie mucocutanee vescicolo-erosive, neuropatie autoimmuni come la sindrome di Guillain Barrè o neuropatie legate alla presenza di anticorpi anti MAG (myelin-associated glycoprotein) [48-51].

E' altresì noto che le patologie autoimmuni rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo di malattie linfoproliferative. La relazione tra patologia autoimmune e rischio di malattia linfoproliferativa è ampiamente dimostrata nella malattia celiaca, nella sindrome di Sjögren e nell'artrite reumatoide,

associate ad una aumentata prevalenza di linfomi intestinali a cellule T e di linfomi B cellulari. E' noto inoltre che le infezioni croniche possono guidare la linfomagenesi. Gli agenti infettivi possono indurre direttamente una trasformazione linfocitaria (con incremento della proliferazione o ridotta apoptosi delle cellule linfoidi) oppure -attraverso la persistenza cronica nei tessuti dell'ospite- favorire una continua proliferazione di cloni linfoidi che rimangono inizialmente dipendenti dalla stimolazione antigenica. Eventi oncogenici intercorrenti, come l'attivazione costitutiva di vie di segnale dovuta a traslocazioni cromosomiche e all'inattivazione di geni oncosoppressori, possono successivamente rendere le cellule linfoidi in grado di proliferare in assenza di stimolazione antigenica. L'infezione da H. pylori e l'infezione cronica da HCV rappresentano i modelli meglio caratterizzati di stimolazione antigenica cronica associati alle malattie linfoproliferative [53-54].

L'angioedema da deficit acquisito di C1 inibitore (C1-INH-AAE) è una sindrome rara spesso misconosciuta, ma con elevata frequenza di associazione a malattia linfoproliferativa. L'angioedema acquisito è caratterizzato da edema ricorrente che può coinvolgere il tessuto sottocutaneo, le pareti gastrointestinali (con quadro di temporanea occlusione intestinale ed intensa addominalgia) e il tratto laringeo con ostruzione delle vie aeree

superiori che può risultare fatale. La riduzione della funzione di C1-INH, spesso collegabile alla presenza di autoanticorpi contro questa proteina, induce l'attivazione della via classica del complemento e del sistema di contatto, con generazione di bradichinina che determina incremento della permeabilità vascolare e angioedema.

Il legame tra malattie linfoproliferative e processi autoimmuni nell'ambito del C1-INH-AAE non è completamente chiarito. Alcune evidenze indicano che, laddove evidenti, autoanticorpi e tessuto neoplastico possono direttamente indurre un consumo di C1-INH e attivazione della via classica del complemento. Nella nostra casistica, la più ampia fino ad oggi descritta, la prevalenza di neoplasie linfoproliferative conclamate è del 30% e ancora più elevata se si considerano le linfoproliferazioni benigne quali le gammopatie monoclonali e l'autoimmunità verso C1-INH [56]

La patologia linfoproliferativa può essere già presente all'insorgenza dei sintomi di angioedema oppure può svilupparsi successivamente. La categoria di malattie linfoproliferative più frequentemente descritta in associazione a C1-INH-AAE è quella dei linfomi indolenti e gli istotipi più frequentemente evidenziati sono i linfomi nodali, i marginali splenici e il linfoma

linfoplasmacitico/malattia di Waldenström. L'associazione a questi istotipi è simile a quella descritta in altre patologie autoimmuni e suggerisce che il linfoma si sviluppa che maturano per affinità di legame con l'antigene. Se questo modello si applichi alle sole forme di deficit acquisito di C1-INH in cui sono evidenziabili autoanticorpi o linfoproliferaazione oppure rappresenti un meccanismo generale di malattia presente in tutti i pazienti deve ancora essere definito. Quello che appare con evidenza è che il deficit acquisito di C1-INH non si genera nel contesto di un disordine dei meccanismi di controllo dell'autoimmunità, ma piuttosto nel contesto di un disordine nel controllo della proliferazione B linfocitaria. Si può quindi disegnare uno scenario in cui il disordine proliferativo dei linfociti B può esprimersi unicamente come autoreattività o evolvere in senso clonale fino ad esprimersi come franca malignità. Indagare le vie di segnale che sono note condurre ad autoimmunità e linfoproliferaazione potrebbe aiutare a capire i meccanismi molecolari che intervengono nei pazienti affetti da C1-INH-AAE [57-59]. Studi di "next-generation sequencing" hanno identificato mutazioni somatiche di myeloid differentiation primary response 88 (MYD88), componente chiave della via di segnale attivata da recettori Toll-like, in circa il 90% dei linfomi linfoplasmacitici e nei linfomi marginali splenici [57-59].

In questo studio riportiamo i dati di una coorte di 72 pazienti affetti da carenza acquisita di inibitore della C1 esterasi. La quota di malattie linfoproliferative è del 33%, la maggior parte di malattie linfoproliferative è costituita da linfomi non follicolari (INFBCLs,) suggerendo nelle carenze acquisite un meccanismo di linfomagenesi antigene mediata.

Scopo dello Studio

Valutare in una coorte di pazienti con carenza acquisita di inibitore della C1-esterasi.

- la prevalenza delle malattia linfoproliferative
- se particolari istotipi di malattia linfoproliferativa prevalgono, rispetto alla popolazione generale

La popolazione di pazienti affetti da carenza acquisita di C1- INH rappresenta un buon modello per lo studio della linfomagenesi antigene mediata per i seguenti motivi:

1. I pazienti con AAE non presentano un quadro di autoimmunità / infiammazione cronica , ma semplicemente presentano produzione di auto-anticorpi anti- C1-INH
2. Le malattie linfoproliferative non rappresentano una incidenza tardiva dell'angioedema acquisito o del suo trattamento e le due condizioni possono evolvere una nell' altra. Autoimmunità e linfoproliferazione possono entrambe essere la prima manifestazione di AEE.
3. Le caratteristiche molecolare di C1-INH possono indurre cloni auto-reattivi

Pazienti e Metodi

Settantadue pazienti con carenza acquisita di C1-INH sono stati arruolati nello studio. La diagnosi di carenza acquisita di C1-INH era basata sulla storia clinica di angioedema senza orticaria iniziata dopo la quarta decade di vita, assenza di storia familiare di angioedema, e livelli plasmatici di C1 inibitore funzionali al di sotto del 50%. L'età mediana alla diagnosi era di 57,5 anni (range 50-66 anni), e la diagnosi è stata fatta all'età media di 63 anni (range 55-72 anni). 15/24 (62,5%) pazienti avevano una diagnosi di malattia linfoproliferativa effettuata prima dell'insorgenza dei sintomi di angioedema. L'edema facciale era la manifestazione clinica di AEE più frequente riportata dal 83% dei pazienti, il 69% dei pazienti presentava angioedema periferico/attacchi addominali, ed il 58% presentava edema del cavo orale o della glottide. 79% degli attacchi acuti, sono stati trattati con un trattamento specifico: 86% ha utilizzato concentrato plasmatico di C1-INH, 46% ha utilizzato Icatibant. Il 24% di questi pazienti ha sviluppato resistenza al concentrato plasmatico o non responsività ed è stato trattato in seconda linea con Icatibant. Gli anticorpi anti C1-INH sono stati trovati nel 71% dei pazienti. Ventiquattro pazienti hanno avuto una diagnosi istologica di linfoma non Hodgkin secondo la classificazione WHO. I pazienti sono stati seguiti per

una mediana di tempo di 15 anni. I seguenti dati clinici sono stati raccolti dalle cartelle cliniche dei pazienti: dati demografici, emocromo completo, lattato deidrogenasi (LDH); stato sierologico dell'epatite B e dell'epatite C, Ann Arbor Stage, International Prognostic Index (IPI), Follicular Lymphoma IPI (FLIPI), dati sul quadro midollare sia morfologici che relativi all'immunofenotipo, presenza di sintomi B, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status, data di diagnosi, tipi di trattamento, date di eventuali recidive, cause di morte e rilievi clinici relativi agli attacchi di angioedema dopo il trattamento del linfoma. I parametri complementari sono stati determinati, su campioni di sangue, congelati a -80 fino al momento del test, attraverso immunodiffusione radiale (Nor Partigen, Low Partigen for C1q Behring, Marburg, Germany); C1-INH antigenico e funzionale sono stati quantificati attraverso immunodiffusione radiale I livelli antigenici di C4, C3 e C1q sono stati misurati attraverso nefelometria o immunodiffusione radiale. Gli autoanticorpi anti C1-INH sono stati testati attraverso metodo immunoenzimatico (ELISA) utilizzando, con qualche modifica, il metodo descritto da Alsenz et al e Cicardi et al [61-62].

Classificazione anatomo-patologica delle malattie linfoproliferative associate alle carenza acquisite di inibitore della C1-esterasi.

Vetrini fissati in ematossilina eosina sono stati valutati dagli specialisti anatomo-patologi. Analisi immunoistochimiche sono state compiute utilizzando CD3, CD20, CD5, CD 10, CD23, BCL6 e ciclina D1 sui tessuti biotici al momento della diagnosi di malattia linfoproliferativa. Le malattie linfoproliferative sono state classificate secondo la classificazione WHO. [60]

Risultati

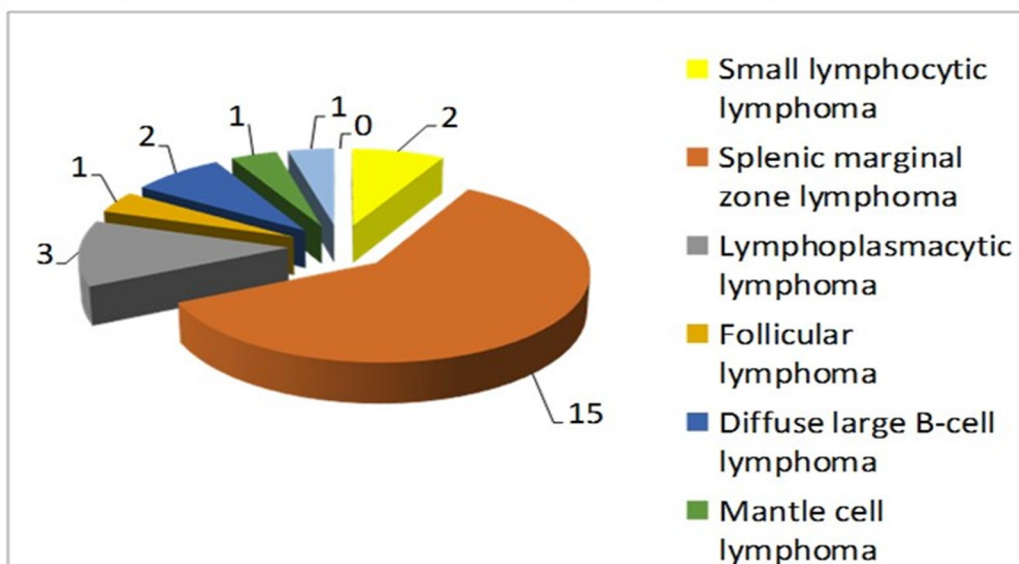
Ventiquattro di 72 pazienti con carenza acquisita di C1-INH (33%) presentava un sottostante linfoma non Hodgkin B cellulare. In 15 pazienti (62.5%) il linfoma non Hodgkin è stato diagnosticato all' insorgenza dei sintomi di Angioedema dopo (da 3 a 7 mesi). Nei restanti 9 pazienti la malattia linfoproliferativa è stata diagnosticata all' insorgenza dei sintomi di angioedema. In base alla classificazione WHO [60].

21 pazienti presentavano una malattia linfoproliferativa indolente, mentre 3 pazienti presentavano un linfoma B cellulare aggressivo (2 linfomi diffusi a grandi cellule B, ed un linfoma mantellare).

I linfomi B cellulari indolenti erano costituiti da linfoma marginale splenico (15 pazienti), linfoma linfoplasmocitico/ malattia di Waldestrom (3 pazienti), 1 linfoma follicolare. Figura 2.

Figura 2: Malattie linfoproliferative secondo la classificazione WHO, in 24 di 72 pazienti con angioedema da carenza acquisita di C1-INH.

Lymphoproliferative diseases according to WHO classification in 24 out of 72 acquired angioedema patients



Positività anticorpale per epatite C è stata riscontrata solo in un paziente.

Anticorpi anti C1-INH sono stati ritrovati in 13/24 (54%) pazienti con AAE e malattia linfoproliferativa, inclusi 12 / 15 casi di linfoma marginale splenico.

La tabella II riporta le caratteristiche cliniche di 20 pazienti con linfoma B cellulare Indolente di tipo non follicolare (INFBCL)

Median age (range)	64 (45-80)
Gender (Male/ Female)	6/14
Performance Status (ECOG)	
0-1	20 (100%)
2-4	0
Ann Arbor Stage	
I/II	5 (25%)
III-IV	15 (75%)
B symptoms	
Absent	18 (90%)
Present	2 (10%)
Serum LDH levels	
Normal	15 (75%)
Elevated	5 (25%)
Unknown	0

Hemoglobin	
≥ 12 g/dl	8 (40%)
≤ 12 g/dl	12 (60%)
HCV antibody serological test	
Negative	19 (95%)
Positive	1 (5%)
Bone Marrow involvement	
Absent	2 (10%)
Present	17 (85%)
Unknown	1 (5%)
International Prognostic Index (IPI)	
Low/ low Intermediate	11 (55%)
High/ high intermediate	9 (45%)
Treatment	
Chemotherapy	13 (65%)
Rituximab alone	2 (10%)
Radiotherapy	0 (0%)
Watchful wait	2 (10%)
Excision Only	3 (15%)

Risultati del trattamento

13/20 con linfoma indolente non follicolare (INFBCL) sono stati trattati con chemioterapia sistemica. I trattamenti chemioterapici includevano trattamenti antraciclinici (ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone, [CHOP]), trattamenti non antraciclinici (ciclofosfamide, clorambucil, vincristina, prednisone [CVP].). cinque pazienti sono stati trattati con Bendamustina e rituximab ottendo remissione completa. Due pazienti sono stati trattati con solo Rituximab. Tre pazienti con linfoma ad alto grado sono stati trattati con trattamento antraciclinico e sono deceduti per progressione della malattia linfoproliferativa. Tre pazienti sono stati trattati con sola splenectomia, ottenendo remissione completa a 5, 6 e 2 anni di follow up. Due pazienti sono ancora “watchful wait” a causa della stabilità della malattia linfoproliferativa. Un paziente con linfoma marginale splenico e concomitante infezione da virus dell’epatite C è attualmente in trattamento con Ribavirina e Interferon in attesa di valutare l’ indicazione ad un eventuale trattamento chemioterapico.

L’ andamento clinico e la risposta alla terapia nei pazienti con malattia linfoproliferativa e concomitante AAE non sembra essere differente dai pazienti con sola malattia linfoproliferativa.

Tutti i pazienti trattati con chemioterapia hanno ottenuto, durante il trattamento chemioterapico, una significativa riduzione della sintomatologia da AAE. In 12 di 18 pazienti abbiamo dimostrato un significativo miglioramento dei parametri complementari dopo trattamento chemioterapico

Tabella II Effetti del trattamento della malattia linfoproliferativa sui parametri clinici e biochimici

Patient	Diagnosis	Treatment regimen	^Clinical improvement of angioedema after treatment	*Complement parameters at diagnosis	*Complement parameters after treatment
1	LPL	R-CHOP	Complete	C1-INH f: <10 C1-INH Ag: 31 C4: < 10 C1q: 97	C1-INH f: 116 C1-INH Ag: 115 C4: 146 C1q: 86
2	LPL	Rituximab + Fludarabine	Complete	C1-INH f: < 10 C1-INH Ag: < 10 C4: < 10 C1q: <10	C1-INH f: 30 C1-INH Ag: 50 C4: < 10 C1q: 100
3	SLL	Chorambucil	Complete	C1-INH f: <10 C1-INH Ag:<10 C4: < 10 C1q: <10	NA
4	SLL	Bendamustine+ Rituximab	Complete	C1-INH f: <10 C1-INH Ag: 9 C4: < 10 C1q: 25	C1-INH f: 30 C1-INH Ag: 50 C4: < 10 C1q: 100

5	SMZL	R-CHOP	Complete	C1-INH f: < 10 C1-INH Ag: < 10 C4: < 10	C1-INH f: 82 C1-INH Ag: 100 C4: 25
6	SMZL	Splenectomy	Complete	C1-INH f: < 10 C1-INH Ag: < 10 C4: < 10	C1-INH f: 52 C1-INH Ag: NA C4: <10
7	SMZL	CTX Prednisone	Complete	C1-INH f: 31 C1-INH Ag: 50 C4: < 10	NA
8	SMZL	R-CVP	Complete	C1-INH f: < 10 C1-INH Ag: < 10 C4: < 10	C1-INH f: 30 C1-INH Ag: 50 C4: < 10
9	SMZL	R-CVP	Complete	C1-INH f: 22 C1-INH Ag: < 10 C4: < 10	C1-INH f: 82 C1-INH Ag: 90 C4: 60
10	SMZL	Splenectomy	Complete	C1-INH f: 18 C1-INH Ag: < 10 C4: 25	C1-INH f: 32 C1-INH Ag: 25 C4: 25
11	SMZL	Splenectomy	Partial	C1-INH f: 18 C1-INH Ag: < 10 C4: 25	NA
12	SMZL	CTX Prednisone	Partial	C1-INH f: <10 C1-INH Ag: < 10 C4: 25	NA
13	SMZL	Rituximab+ Bendamustine	Complete	C1-INH f: <10 C1-INH Ag: < 10 C4: <10	NA
14	SMZL	Rituximab+ Bendamustine	Complete	C1-INH f: 37 C1-INH Ag: < 25 C4: <10	C1-INH f: 73 C1-INH Ag: 70 C4: 25
15	SMZL	Rituximab+ Bendamustine	Complete	C1-INH f: <10 C1-INH Ag: < 10 C4: <10	NA
16	SMZL	Rituximab+ Bendamustine	Complete	C1-INH f: 33 C1-INH Ag: < 10 C4: 25	C1-INH f: 73 C1-INH Ag: 70 C4: 25

^Complete: < 1 angioedema attack/year

^Partial: 50% reduction in attacks frequency compared to pre-treatment

LPL: lymphoplasmocytic lymphoma; SLL: small lymphocytic lymphoma, SMZL: splenic marginal zone lymphoma

R – CHOP: (rituximab–cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone)

CEOP; (Cyclophosphamide-Etoposide-Prednisolone-Vincristine)

R CVP : (rituximab–cyclophosphamide, vincristine, and prednisone) CVP: (cyclophosphamide, vincristine, and prednisone)

CTX: Cyclophosphamide

NA: not available

*Parameters (see text) are expressed as percentage of normal pooled plasma

Discussione e conclusioni

La proliferazione B cellulare, frequentemente con caratteristiche clonali , sembra determinare la carenza acquisita di C1-INH e la produzione di anticorpi inibenti/neutralizzanti C1-INH. Il legame tra i cloni B cellulari patologici e la carenza acquisita di C1-INH è evidenziata dalla presenza di anticorpi monoclonali, che clivano/inattivano C1-INH. In presenza di una malattia linfoproliferativa o di una MGUS la relazione causa effetto è supportata da alcune evidenze: 1) maggior prevalenza di MGUS nei pazienti affetti da carenza acquisita di C1-INH rispetto alla popolazione generale 2) alcune evidenze sperimentali che indicano che il tessuto linfatico di pazienti affetti da AAE, fissa C1-INH e/o attiva la via classica del complemento. 3) l'evidenza che la componente M riconosce e si lega a C1-INH. 4) l'evidenza di diversi gradi di remissione dalla sintomatologia tipica del AAE e della normalizzazione dei parametri complementare durante le fasi di remissione della malattia linfoproliferativa.

In questo studio abbiamo descritto 24 pazienti da carenza acquisita di C1-INH con associata malattia linfoproliferativa, 20 dei quali rappresentati da linfomi indolenti, non follicolari a cellule B (INFBCL).

Alcune malattie linfoproliferative sembrano svilupparsi a partire da proliferazione B linfocitaria policlonale, che in risposta a stimoli si trasformano in proliferazioni monoclonali/neoplastiche.

Questo modello patogenetico è emerso dall'osservazione che alcune malattie linfoproliferative insorgono in seguito alla stimolazione antigenica cronica da parte di agenti infettivi (Es H Pylori e HCV) o nell'ambito di malattie infiammatorie croniche (malattie linfoproliferative associate alla malattia di Sjogren) o autoimmuni.

In questo studio, noi abbiamo confermato che i pazienti affetti da carenza acquisita di C1-INH presentano un rischio aumentato rispetto alla popolazione generale di presentare malattie linfoproliferative. Tale rischio però non sembra essere generico ma confinato ad alcuni istotipi particolari che risultano essere rare nella popolazione generale. Questa nostra osservazione, sembra essere supportata da segnalazione isolati di associazione tra carenza acquisita di C1-INH e alcuni linfomi non follicolari (linfomi marginali, linfomi linfoplasmocitoidi, linfomi marginali splenici). [63-65]. Nella nostra casistica, attualmente la più ampia riportata in letteratura, la malattia linfoproliferativa prevalente nei pazienti con AAE è rappresentata dal linfoma marginale

splenico con una prevalenza del 75% di INFBCL (15/20 linfomi indolenti), e 62.5% di tutte le malattie linfoproliferative.

Da un punto di vista istologico, il linfoma marginale si distingue dal linfoma follicolare o dal linfoma mantellare, per alcune caratteristiche fenotipiche e strutturali [66]. Dal punto di vista della patogenesi e della sua filogenesi il linfoma marginali deriva da cellule che vanno incontro a trasformazione clonale dopo essere passate dal centro germinativo, cioè dopo il contatto con antigeni. E' pertanto verosimile che stimoli antigenici continui, possono pertanto indurre una trasformazione prima oligoclonale e successivamente monoclonale di questi linfociti. Una conferma di tale ipotesi deriva dall'osservazione epidemiologica della elevata prevalenza di linfomi marginali in pazienti con crioglobulinemia e infezioni da virus dell'epatite C [55] o nell'ambito di patologie autoimmuni dove la stimolazione antigenica risulta evidente. [53, 56-57]. Alcuni studi sperimentali, hanno individuato come i sistemi di segnale NOTCH, MYD88 and NF-kB rappresentino i principali sistemi di segnale nel meccanismo della trasformazione neoplastica [58] nei linfomi marginali e nei linfomi linfoplasmocitoidi. Recenti studi hanno identificato come mutazioni di MYD88 L265P rappresentano il primo evento che conduce alla modificazione nei meccanismi di differenziazione delle

cellule B nei linfomi marginali, linfoplasmocitoidi, nelle leucemie linfatiche croniche [68] e nella gammopatie di incerto significato specie nelle forme IgM.

Nonostante sia stata segnalata una stretta relazione tra INFBCLs e infezione da HCV noi abbiamo trovato nella nostra casistica un solo paziente con infezione da HCV.

In conclusioni il nostro studio suggerisce le carenza acquisite di C1-INH si associano a proliferazione B cellulare, con caratteristiche clonali e possono essere responsabili della produzione di autoanticorpi anti C1-INH come di malattie linfoproliferative. L' origine post centro germinativo della maggior parte delle patologie linfoproliferative osservate nella nostra casistica sembra suggerire che la stimolazione antigenica cronica possa contribuire al meccanismo di linfomagenesi. C1-INH appartiene alla famiglia delle serin proteasi, e presenta un ampio range di modificazione dopo la sua interazione con la proteasi, probabilmente esponendo antigeni non normalmente noti che determinano una stimolazione cronica dei cloni B cellulari, sottoponendoli ad una proliferazione clonale o in presenza di ulteriori mutazioni delle vie di segnale ad una proliferazione neoplastica.

In alternativa il legame dell'anticorpo con C1-INH può rappresentare lo stimolo antigenico che stimola la proliferazione e la successiva trasformazione dei cloni B cellulari.

Future direzioni di ricerca

Le domande ancora aperte sull' agente responsabile della proliferazione clonale hanno stimolato un progetto di ricerca attivo e tuttora in corso in collaborazione con l'Università del Piemonte Orientale, L' Ospedale San Raffaele e il centro Oncologico di Aviano per definire il ruolo patogenetico degli autoanticorpi che si evidenziano nel plasma dei soggetti con C1-INH-AAE ed il loro legame con la presenza di alterazioni molecolari responsabili di linfomagenesi.

Pazienti e metodi

La nostra casistica consta di 72 pazienti con diagnosi di C1-INH-AAE, 24 di questi pazienti hanno una diagnosi confermata istologicamente di patologia linfoproliferativa.

Per definire il meccanismo con cui gli autoanticorpi inducono un deficit di C1-INH ne delineeremo le caratteristiche considerando la popolazione dei nostri pazienti suddivisa in 3 sottogruppi:

- 1) pazienti con carenza acquisita di C1-INH ed autoanticorpo anti C1-INH senza evidenza né di patologia linfoproliferativa conclamata, né di MGUS

2) pazienti con carenza acquisita di C1-INH ed autoanticorpo anti C1-INH e MGUS (con banda monoclonale dello stesso o di diverso isotipo rispetto all'autoanticorpo)

3) pazienti con carenza acquisita di C1-INH, autoanticorpo anti C1-INH e patologia linfoproliferativa conclamata

In tutti i pazienti in cui sono evidenziabili, valuteremo l'affinità, la specificità e la capacità neutralizzante degli autoanticorpi anti C1-INH. Questi test verranno eseguiti su siero e su anticorpi purificati con cromatografia per affinità. Come sorgente di C1-INH per la definizione dell'affinità, utilizzeremo il derivato plasmatico della proteina (Behrinert) che presenta un grado di purezza superiore al 90%. La specificità sarà invece determinata su antigeni comuni come da protocolli standardizzati. La capacità neutralizzante verrà invece determinata mediante metodo cromogenico su componenti purificate come precedentemente descritto. Le immunoglobuline dei pazienti verranno caratterizzate per punto isoelettrico mediante isoelettrofocusing (IEF) su gel di poliacrilamide. In questo modo verrà identificato lo spettro tipo corrispondente per ciascuna componente monoclonale.

I pazienti nei quali non sono stati identificati anticorpi contro il C1-INH potrebbero produrre anticorpi contro neo-epitopi presenti in diverse forme strutturali di C1-INH, che non possono essere identificati mediante il test ELISA attualmente utilizzato. Al fine di identificare tali anticorpi intendiamo sviluppare un metodo ELISA che utilizzi diverse forme strutturali di C1-INH in fase solida (forme latente, clivata e polimerica). L'analisi sarà effettuata anche mediante Western Blot: le diverse forme di C1-INH verranno fatte migrare in un gel di poliacrilamide in condizioni native e trasferite su membrana, le bande corrispondenti verranno visualizzate con gli anticorpi dei pazienti e con anticorpi policlonali commerciali in grado di riconoscere le diverse forme. Le bande positive agli anticorpi dei pazienti, che verranno eventualmente identificate, corrispondono alle forme contro cui questi sono diretti.

In collaborazione con il Centro Oncologico di Aviano verrà studiato l'immunofenotipo e, nei campioni di pazienti affetti da malattia linfoproliferativa conclamata, verrà ricercata la mutazione L265P del gene MYD88 e, successivamente effettuata caratterizzazione immunogenetica (studio del BCR) e studio di mutazioni altre da MyD88 L265P. Per tali studi potrà essere selezionata la popolazione clonale (CD19+ clonali vs. CD3) tramite

cell sorting. In una fase successiva ci proponiamo di eseguire studi utilizzando C1-INH marcato per isolare cloni B che portino un BCR che lega C1-INH.

Risultati attesi

- Gli studi sugli autoanticorpi ci daranno informazioni riguardanti la loro origine (anticorpi naturali o maturati per affinità) e la loro effettiva capacità di determinare il deficit di C1 inibitore ed essere quindi considerati autoanticorpi patogenetici
- Tramite l'immunofenotipo ci attendiamo di poter identificare dei cloni autoreattivi per C1-INH nei pazienti con carenza acquisita di C1-INH anche in assenza di malattia linfoproliferativa. In questi cloni potremo verificare se è presente mutazione del gene di MYD88 già in fase pre-neoplastica. Nei pazienti con patologia linfoproliferativa conclamata otterremo informazioni rispetto alla frequenza con cui ricorre la mutazione di tale gene;
- Ci attendiamo infine che le mutazioni di MYD88 possano avere valore prognostico per lo sviluppo di patologia linfoproliferativa in pazienti con angioedema acquisito.

BIBLIOGRAFIA

1. Caldwell JR, Ruddy S, Schur PH, Austen KF. Acquired C1- inhibitor deficiency in lymphosarcoma. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1972; 1:39–52.
2. Agostoni A, Aygören-Pürsün E, Binkley KE, et al. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004;114(Suppl. 3):S51–131
3. Longhurst H, Cicardi M. Hereditary angio-oedema. *Lancet* 2012; 379:474–81.
4. Kaplan AP. C1 inhibitor deficiency: hereditary and acquired forms. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 2001;11:211–9.
5. Cugno M, Nuijens J, Hack E, et al. Plasma levels of C1- inhibitor complexes and cleaved C1-inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. *Journal of Clinical Investigation* 1990; 85:1215–20.

6. Schapira M, Silver LD, Scott CF, et al. Prekallikrein activation and highmolecularweight kininogen consumption in hereditary angioedema. *New England Journal of Medicine* 1983;308:1050–3.
7. Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, et al. Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood* 1997;89:3213–8
8. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 1998;351:1693–7.
9. Nussberger J, Cugno M, Cicardi M. Bradykinin-mediated angioedema. *New England Journal of Medicine* 2002;347:621–2.
10. Cugno M, Cicardi M, Agostoni A. Activation of the contact system and fibrinolysis in autoimmune acquired angioedema: a rationale for prophylactic use of tranexamic acid. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1994; 93:870–6.
11. Kleniewski J, Blankenship DT, Cardin AD, Donaldson V. Mechanism of enhanced kinin release from high molecular weight kininogen by plasma kallikrein after its exposure to plasmin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1992;120:129–39. [12] Cugno M, Hack CE, de Boer JP, Eerenberg AJ, Agostoni A, Cicardi M. Generation of plasmin during

- acute attacks of hereditary angioedema. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1993; 121:38–43.
12. Cugno M, Hack CE, de Boer JP, Eerenberg AJ, Agostoni A, Cicardi M. Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1993; 121:38–43.
13. Jackson J, Sim RB, Whelan A, Feighery C. An IgG autoantibody which inactivates C1-inhibitor. *Nature* 1986; 323(6090):722–4.
14. Schreiber AD, Zweiman B, Atkins P, et al. Acquired angioedema with lymphoproliferative disorder: association of C1-inhibitor deficiency with cellular abnormality. *Blood* 1976;48:567–80.
15. Hauptmann G, Petitjean F, Lang JM, Oberling F. Acquired C1-inhibitor deficiency in a case of lymphosarcoma of the spleen. Reversal of complement abnormalities after splenectomy. *Clinical and Experimental Immunology* 1979; 37:523–31.
16. Cicardi M, Zingale LC, Pappalardo E, Folcioni A, Agostoni A. Autoantibodies and lymphoproliferative diseases in acquired C1-inhibitor deficiencies. *Medicine* 2003;82:274–81.
17. Cicardi M, Beretta A, Colombo M, Gioffre D, Cugno M, Agostoni A. Relevance of lymphoproliferative disorders and of anti-C1-inhibitor

- autoantibodies in acquired angio-oedema. *Clinical and Experimental Immunology* 1996; 106:475–80.
18. Jackson J, Sim RB, Whaley K, Feighery C. Autoantibody facilitated cleavage of C1-inhibitor in autoimmune angioedema. *Journal of Clinical Investigation* 1989;83:698–707.
19. Zuraw BL, Curd JG. Demonstration of modified inactive first component of complement C1-inhibitor in the plasmas of C1-inhibitor-deficient patients. *Journal of Clinical Investigation* 1986; 78:567–75.
20. Geha RS, Quinti I, Austen KF, Cicardi M, Sheffer A, Rosen FS. Acquired C1-inhibitor deficiency associated with antiidiotypic antibody to monoclonal immunoglobulins. *New England Journal of Medicine* 1985; 312:534–40.
21. D'Incan M, Tridon A, Ponard D, et al. Acquired angioedema with C1-inhibitor deficiency: is the distinction between type I and type II still relevant? *Dermatology* 1999;199:227–30.
22. Jackson J, Sim RB, Whaley K, Feighery C. Autoantibody facilitated cleavage of C1-inhibitor in autoimmune angioedema. *Journal of Clinical Investigation* 1989;83:698–707.

23. Zuraw BL, Curd JG. Demonstration of modified inactive first component of complement C1-inhibitor in the plasmas of C1-inhibitor-deficient patients. *Journal of Clinical Investigation* 1986; 78:567–75.
24. Cugno M, Castelli R, Cicardi M. Angioedema due to acquired C1-inhibitor deficiency: a bridging condition between autoimmunity and lymphoproliferation. *Autoimmunity Reviews* 2008; 8:156–9.
25. Cugno M, Zanichelli A, Foieni F, Caccia S, Cicardi M. C1 inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress. *Trends in Molecular Medicine* 2009; 15:69–78.
26. Davis AE, 3rd, Lu F, Mejia P. C1-inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thrombosis and Haemostasis* 2010; 104:886–93.
27. Van Nostrand WE, McKay LD, Baker JB, Cunningham DD. Functional and structural similarities between protease nexin I and C1-inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263:3979–83.
28. Cugno M, Bos I, Lubbers Y, Hack CE, Agostoni A. In vitro interaction of C1-inhibitor with thrombin. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2001;4:253–60.

29. Caccia S, Castelli R, Maiocchi D, Bergamaschini L, Cugno M. Interaction of C1-inhibitor with thrombin on the endothelial surface. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2011; 7:571–5.
30. Garcia JGN, Siflinger-Birnboim A, Bizios R, Del Vecchio PJ, Fenton II JW, Malik AB. Thrombin induced increase in albumin permeability across the endothelium. *Journal of Cellular Physiology* 1986; 128:96–104.
31. Garcia JGN, Pavalko FM, Patterson CE. Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1995; 6:609–26.
32. Siller-Matula JM, Schwameis M, Blann A, Mannhalter C, Jilma B. Thrombin as a multi-functional enzyme. Focus on in vitro and in vivo effects. *Thrombosis and Haemostasis* 2011; 106:1020–33.
33. van Geffen M, Cugno M, Lap P, Loof A, Cicardi M, van Heerde W. Alterations of coagulation and fibrinolysis in patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Clinical and Experimental Immunology* 2012; 167:472–8.

34. Agostoni A, Cicardi M. Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine* 1992;71:206
35. Zingale LC, Castelli R, Zanichelli A, Cicardi M. Acquired C1- inhibitor deficiency: presentation, diagnosis, course and convention management. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2006;26:669–90
36. Cicardi M, Aberer W, Banerji A, Bas M, Bernstein JA, Bork K, et al.; HAWK under the patronage of EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology). Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy* 2014;69:602–16.
37. Cicardi M, Zingale LC, Pappalardo E, Folcioni A, Agostoni A. Autoantibodies and lymphoproliferative diseases in acquired C1- inhibitor deficiencies. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82:274–81.
38. Zanichelli A, Bova M, Coerezza A, Petraroli A, Triggiani M, Cicardi M. Icatibant treatment for acquired C1-inhibitor deficiency: a real-world observational study. *Allergy* 2012; 67:1074–7.

39. Patel NS, Fung SM, Zanichelli A, Cicardi M, Cohn JR. Ecallantide for treatment of acute attacks of acquired C1 esterase inhibitor deficiency. *Allergy Asthma Proc* 2013; 34:72–7.
40. Kaur R, Williams AA, Swift CB, Caldwell JW. Rituximab therapy in a patient with low-grade B-cell lymphoproliferative disease and concomitant acquired angioedema. *J Asthma Allergy* 2014; 7:165–7.
41. Branellec A, Bouillet L, Javaud N, Mekinian A, Boccon-Gibod I, Blanchard-Delaunay C, et al; French National Reference Center for Angioedema (CREAK). Acquired C1-inhibitor deficiency: 7 patients treated with rituximab. *J Clin Immunol* 2012; 32:936–41.
- 42.. Dreyfus DH, Na CR, Randolph CC, Kearney D, Price C, Podell D. Successful rituximab B lymphocyte depletion therapy for angioedema due to acquired C1 inhibitor protein deficiency: association with reduced C1 inhibitor protein autoantibody titers. *Isr Med Assoc J* 2014; 16:315–6.
43. Cicardi M, Zingale LC, Pappalardo E, Folcioni A, Agostoni A. Autoantibodies and lymphoproliferative diseases in acquired C1-inhibitor deficiencies. *Medicine* 2003; 82:274–81.

44. Cicardi M, Beretta A, Colombo M, Gioffre D, Cugno M, Agostoni A.
Relevance of lymphoproliferative disorders and of anti-C1-inhibitor autoantibodies in acquired angio-oedema. *Clinical and Experimental Immunology* 1996; 106:475–80.
45. Castelli R, Deliliers DL, Zingale LC, Pogliani EM, Cicardi M
Lymphoproliferative disease and acquired C1-inhibitor deficiency. *Haematologica* 2007; 92:716–
46. Fremeaux-Bacchi V, Guinnee MT, Cacoub P, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy in patients presenting with acquired angioedema type 2. *American Journal of Medicine* 2002; 113: 194–9.
47. Smedby KE, Askling J, Mariette X, Baecklund E. Autoimmune and inflammatory disorders and risk of malignant lymphomas--an update. *J Intern Med.* 2008; 264(6):514-27. 3.
48. Hodgson K, Ferrer G, Pereira A, Moreno C, Montserrat E. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia: diagnosis and treatment. *Br J Haematol.* 2011; 154(1):14-22.

49. Jung M, Rice L. Unusual autoimmune non hematologic complications in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2011;11 Suppl 1:S10-3.
50. Ramchandren S, Lisak RP. The immunopathogenesis of Guillain-Barre syndrome. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2010;8(3):203-6.
51. Seffo F, Daw HA. Non-Hodgkin lymphoma and Guillain-Barre syndrome: a rare association. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2010;8(3):201-3.
52. Nobile-Orazio E. Neuropathy and monoclonal gammopathy. *Handb Clin Neurol.* 2013; 115:443-59.
53. Dias C, Isenberg DA. Susceptibility of patients with rheumatic diseases to B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(6):360-8.
54. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet.* 1991;338(8776):1175-6.
55. Monti G, Pioltelli P, Saccardo F, Campanini M, Candela M, Cavallero G, et al. Incidence and characteristics of non-Hodgkin lymphomas in a multicenter case file of patients with hepatitis C virus-related symptomatic mixed cryoglobulinemias. *Arch Intern Med.* 2005; 165(1):101-5.

56. Wu MA, Castelli R. The Janus faces of acquired angioedema: C1-inhibitor deficiency, lymphoproliferation and autoimmunity. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2015.
57. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, Bruscaggin A, Rasi S, Spina V, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med*. 2012; 209(9):1537-51.
58. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208(7):1389-401.
59. Rossi D, Deaglio S, Dominguez-Sola D, Rasi S, Vaisitti T, Agostinelli C, et al. Alteration of BIRC3 and multiple other NF-kappaB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. *Blood*. 2011; 118(18):4930-4.
60. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J. & Vardiman, J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 2008, 4th end International Agency for Research on Cancer Press, Lyon, France.

61. Alsenz, J., Bork, K. & Loos, M. Autoantibody- mediated acquired deficiency of C1 inhibitor. *New England Journal of Medicine* 1987, 316, 1360–1366
62. Cicardi, M., Zingale, L.C , Pappalardo E , Folcioni, A. Agostoni, A. Autoantibodies and lymphoproliferative diseases in acquired C1 inhibitor deficiencies. *Medicine (Baltimore)* 2003 82, 274–281.
63. Sugisaki, K., Itoh, K. & Tamaru, J. Acquired C1-esterase inhibitor deficiency and positive lupus anticoagulant accompanied by splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2007, 25, 627– 629.
64. Lam, D.H., Levy, N.B., Nickerson, J.M., Gruenberg, D.A. Lansigan , F. Acquired angioedema and marginal zone lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2012, 30, e151–e153.
65. Ates, O., Sunar, V., Babacan, T., Akin, S., Kertmen, N. & Altundag, K. (2015) Acquired C1 esterase inhibitor deficiency in a marginal zone lymphoma patient treated with rituximab. *Journal of BUON*, 20, 349.
66. Troussard, X., Valensi, F., Duchayne, E., Garand, R., Felman, P., Tulliez, M., Henry-Amar, M., Bryon, P.A. & Flandrin, G. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: clinical presentation, biology and prognostic

factors in a series of 100 patients. Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC). British Journal of Haematology 1996 93, 731–736.

67. Rossi, D., Trifonov, V., Fangazio, M., Bruscaggin, A., Rasi, S., Spina, V., Monti, S., Vaisitti, T., Arruga, F., Fama, R., Ciardullo, C., Greco, M., Cresta, S., Piranda, D., Holmes, A., Fabbri, G., Messina, M., Rinaldi, A., Wang, J., Agostinelli, C., Piccaluga, P.P., Lucioni, M., Tabbo, F., Serra, R., Franceschetti, S., Deambrogi, C., Daniele, G., Gattei, V., Marasca, R., Facchetti, F., Arcaini, L., Inghirami, G., Bertoni, F., Pileri, A., Deaglio, S., Foa, R., Dalla-Favera, R., Pasqualucci, L., Rabadan, R. & Gaidano, G. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. Journal of Experimental Medicine, 2012: 209, 1537–1551.

68. Spina, V., Martuscelli, L. & Rossi, D. (2015) Molecular deregulation of signaling in lymphoid tumors. European Journal of Haematology 2015, 95, 257–269.

